SUZUKACILLIN A: SEQUENZIERUNG UND KONFORMATIONS-UNTERSUCHUNGEN EINES MEMBRANMODIFIZIERENDEN EIKOSAPEPTIDS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Ellen Katz
aus Altensteig

1983

UNIV.
LEIDEN
NHL

SUZUKACILLIN A: SEQUENZIERUNG UND KONFORMATIONS-UNTERSUCHUNGEN EINES MEMBRANMODIFIZIERENDEN EIKOSAPEPTIDS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Ellen Katz
aus Altensteig

1983

Tag der mündlichen Prüfung	: 5.12.1983
Dekan	: Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter	: Prof. Dr. G. Jung
2. Berichterstatter	: Prof. Dr. E. Bayer

Meinen Eltern

und Iris

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0038

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Günther Jung

in der Zeit von Dezember 1980 bis April 1983 im Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Günther Jung
danke ich herzlich für die Themenstellung, die zahlreichen wertvollen Anregungen und Diskussionen und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Mein Dank gilt ferner Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer für die Überlassung von Institutseinrichtungen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Antibiotische Aktivitäten von Suzukacillin A und verwandten Peptidantibiotika	4
1.2.	Membranmodifizierende Wirkungen	5
1.3.	Problemstellung	10
2.	Kultur und Isolierung von Suzukacillin A	12
2.1.	Reinigung des Rohextraktes	12
3.	Charakterisierung von Suzukacillin A, Bestimmung von C- und N-Terminus	14
3.1.	Aminosäurenbestimmung	14
3.1.1.	Qualitative Aminosäurenanalyse und Konfigurationsbestimmung durch GC-MS	16
3.1.2.	Quantitative Aminosäurenanalyse durch Ionenaustauscherchromatographie	20
3.1.3.	Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie	21
3.2.	Nachweis von Ac-Aib-OH in Suzukacillin A und Ac-Iva-OH in Suzukacillin B	23
3.3.	Bestimmung der Position von Glutamin und Glutaminsäure	25
3.4.	Nachweis von L-Phenylalaninol	28
4.	Sequenzierung	29
4.1.	Sequenzierungsstrategie und Säurelabilität	29
4.1.1.	Selektive Trifluoracetolyse von Suzukacillin	31
4.2.	Isolierung der Partialsequenzen nach Trifluoracetolyse von Suzukacillin A	36
4.3.	Sequenzierung isolierter Fragmente aus Suzukacillin A durch GC-MS	39

4.3.1.	Massenspektrometrische Untersuchung der C-terminalen Prolylheptapeptide	40
4.3.2.	Massenspektrometrische Untersuchungen des N-terminalen Dodekapeptids	46
4.3.3.	Massenspektrometrische Untersuchung des Tripeptides Gly-Leu-Aib	51
4.3.4.	Massenspektrometrische Untersuchung von kurzen Partialsequenzen	52
4.4.	Molmassenbestimmung durch FAB-MS und FD-MS	53
5.	Konformationsuntersuchungen	57
5.1.	Circulardichroismus	57
5.2.	^{13}C-NMR Untersuchungen	64
6.	Membranmodifizierende Eigenschaften	83
6.1.	Hämolytische Eigenschaften	83
6.2.	Spannungsabhängige Ionenleitung	86
7.	Experimenteller Teil	91
7.1.	Umkristallisation von Suzukacillin A	91
7.2.	Gelchromatographie an Sephadex LH 20	91
7.3.	Chromatographie an Kieselgel	93
7.4.	Dünnschichtchromatographie	94
7.4.1.	Fließmittelsysteme	95
7.4.2.	Sprühreagentien	95
7.5.	Aminosäurenanalyse	96
7.6.	Acidolyse von Suzukacillin A und Isolierung von Partialsequenzen	97
7.7.	Sequenzierung durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie	108
7.8.	Felddesorptions-Massenspektrometrie	109

7.9. Fast Atom Bombardment 109
7.10. Nachweis des L-Phenylalaninols durch Gaschromatographie 109
7.11. DC-Vergleich natürlicher und synthetischer C-Termini von Suzukacillin A und Alamethicin F30 110
7.12. Circulardichroismus zur Bestimmung der Sekundärstruktur 110
7.13. ^{13}C-NMR Spektroskopie 111
7.14. Derivate der Bienengiftkomponente Melittin 112
7.15. Derivate von Trichotoxin A40 112
7.16. Synthese des C-terminalen Prolylheptapeptids von Suzukacillin A 114
8. Zusammenfassung 116
9. Literaturverzeichnis 119

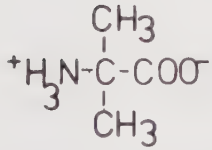
Verzeichnis der Abkürzungen

Aib	α-Aminoisobuttersäure
Ac	Acetyl
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
c	Konzentration
CD	Circulardichroismus
DC	Dünnschichtchromatographie
FD-MS	Felddesorptions-Massenspektroskopie
FAB-MS	Fast Atom Bombardment-Massenspektroskopie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
min	Minute
NMR	Kernmagnetische Resonanz
OBzl	Benzylester
OMe	Methylester
Pheol	(S)-2-Amino-1-hydroxy-3-phenyl-propan
SZ A	Suzukacillin A
TDM	4,4-Tetramethyldiaminodiphenylmethan
TFA	Trifluoressigsäure

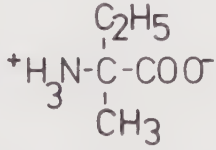
Die Abkürzungen der Aminosäuren entsprechen den IUPAC-Regeln

1.Einleitung

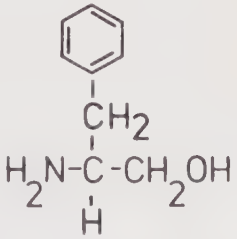
Seit 1966 konnten aus Mikroorganismen der Klasse Ascomycetes-Deuteromycetes (Trichoderma sp., Stilbella sp., Cephalosporium sp., Samorospora sp.) verschiedene lipophile Peptidantibiotika isoliert werden (Tab.1.1).
Diese Pilze produzieren in Kultur sequenzanaloge lipophile Peptide mit Molmassen um 2000, die alle antibakteriell und antifungizid wirksam sind. Charakteristisch ist neben anderen apolaren Aminosäuren ihr hoher Gehalt an der selten vorkommenden α-Aminoisobuttersäure (2-Methylalanin), sowie einem Aminoalkohol (Phenylalaninol, Leucinol, Valinol) und meist auch Isovalin (2-Ethylalanin).



α-Aminoisobuttersäure



Isovalin



Phenylalaninol

Bedeutung haben sie bisher weniger wegen ihrer antimikrobiellen als vielmehr wegen ihrer ausgeprägten membranmodifizierenden Wirkung. Suzukacillin wurde 1965 aus dem Trichoderma viride Stamm 63 C-I von Ooka et al. (1-4) isoliert. Es zeigt membranaktive Eigenschaften, die denen des Alamethicins sehr ähnlich sind (5). 1976 veröffentlichten Jung et al.

UNIV. LEIDEN

(6) eine erste Untersuchung zur Primärstruktur und Konformation des Suzukacillin A, der Hauptkomponente des Antibiotikums. Die kombinierte GC-MS Analyse trifluoracetylierter Peptidmethylester von Partialhydrolysaten ergab 23 Aminosäurereste, von denen 10 als Aib identifiziert wurden. Es wurde eine Reihe von Fragmenten erhalten, die bereits vom Alamethicin her bekannt waren. C-13 NMR Spektren bei 22,63 MHz deuteten jedoch darauf hin, daß das untersuchte kristalline Suzukacillin A natürliche Analoga enthielt. Auch der Aminoalkohol Phenylalaninol konnte nachgewiesen werden, was die Ähnlichkeit der zwei Peptide unterstrich.

Tab.1.1 Aib enthaltende, lipophile Peptidantibiotika

Suzukacillin A und B (1966)	Ref.:(1-7)
Alamethicin (1967)	(8-19)
Antiamoebin I und II (1967)	(20-29)
Stilbellin (1971)	(30)
Trichotoxin A und B (1972)	(31)
Emericin II,III und IV (1974)	(32-33)
Zervamycin I und II (1974)	(34)
Samarosporin (1976)	(35-36)
Trichotoxin A 40 und A 50 (1977)	(37-45)
Trichopolyn A und B (1979)	(46)
Hypelcin A und B (1979)	(47)
Efrapeptin D (1982)	(132)
Paracelsin (1982)	(133)

Eine vergleichende Untersuchung über die antimikrobiellen Eigenschaften von Trichotoxin A-40, Alamethicin F-50 und Suzukacillin A ergab nur geringe Unterschiede (Tab.1.4) (17).

Antiamoebin I (II)

```
    1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11  12  13  14  15  16
Ac-Phe-Aib-Aib-Aib-Iva-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-Iva-Hyp-Aib-Pro-Pheol
                                          (Pro)
```

Hypelcin A

```
    1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11  12  13  14  15  16  17  18  19  20
Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Leu-Aib-Gly-Aib-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Glu-Leuol
```

Alamethicin I (II)

```
    1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11  12  13  14  15  16  17  18  19  20
Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol
                    (Aib)
```

Trichotoxin A-40

```
    1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11  12  13  14  15  16  17  18
Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Glu-Vol
      (Ala)                     (Ala)                     (Aib)
```

Suzukacillin A

```
    1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11  12  13  14  15  16  17  18  19  20
Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Aib-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
                    (Aib)       (Leu)                           (Iva)
```

Tab. 1.2. Aminosäuresequenz von Polypeptidantibiotika mit α-Dialkyl-α-aminosäuren

	antibakteriell	antifungisch	anti-helminth.	protozoid
Suzukacillin	Bacillus subtilis Xanthomonas oryzae Sarcina lutea Strptococcus pyogenes Cornebakterium diphteriae Mycobakterium phlei 10-100 µg/ml (1)	Aspergillus niger Trichophyton fumigatus Sacharomyces sake 10-100 µg/ml (1)	-	Eimeria tenella Eimeria necatrix (Coccidiosis) (7)
Antimoebin	-	schwach	Dracunculus medinensis	Trypanosoma evansii (23) 10 mg/kg Körpergew. Trichomonas vaginalis(23) in vitro 2-4 µg/ml
Stilbellin	Bacillus subtilis(30) Staphyllococcus aureus 20 µg/ml (30) Escherichia coli Klebsiella pneumoniae 50 µg/ml (30)	-	-	Trichomonas vaginalis(30)
Emericin II-IV	-	-	-	Ochromonas danica Crythidia fasciculata Tetrahymena pyriformis 50-100 µg/ml (32)
Hypelcin A/B	-	Lentinus eddodes 300 ppm (47)	-	-
Trichopolyn A/B	Grampos. Bakterien Bacillus subtilis Staphyllococcus aureus 6,25 µg/ml Sacharomyces cerevisiae 10-20 µg/ml (46) u.a.	Lentinus eddodes(46) Candida utilis 0,78 µg/ml (46)	-	-

Tab. 1.3. Antibiotische Aktivitäten von Suzukacillin A und verwandten Peptidantibiotika

Tab.1.4 Plattendiffusionstest mit Filterrondellen, die mit äthanolischen Lösungen der angegebenen Konzentrationen von Alamethicin (A), Suzukacillin (S) und Trichotoxin (T) getränkt waren. Temperatur: Bakterien 37°C, Pilze 25°C; Inkubationszeit 24 h, Hemmhofdurchmesser in mm.

Testorganismus	$2x10^{-3}$mol/l			$1x10^{-3}$mol/l			$7x10^{-4}$mol/l			$4x10^{-4}$mol/l		
	A	S	T	A	S	T	A	S	T	A	S	T
Bacillus subtilis	7,5	5,5	7	7	5	6	6	4	2,5	4,5	2,5	1
Staphylococcus aur.	6	6,5	7	6,5	6	7	4	4,5	4,5	3,5	4	3
Escherichia coli K12				Keine Hemmung								
Sacharomyces cerevisiae	1	1,5	2	0,5	1	1	-	-	-	-	-	-

1.2. Membranmodifizierende Wirkungen

Die bemerkenswerteste Eigenschaft von Alamethicin ist seine Fähigkeit, in künstlichen Lipid - Doppelmembranschichten eine charakteristische spannungsabhängige Ionenleitung hervorzurufen. Diese Spannungsabhängigkeit des Ionenstromes ist wegen seines Modellcharakters bezüglich der Aktionspotentiale an Nervenaxomen bedeutsam (48). Suzukacillin A (5) und Trichotoxin A-40 (39) zeigen ähnliche Eigenschaften. Im Gegensatz zu Carriermechanismen wie bei Valinomycin (49) oder Kanalbildung bei Gramicidin A (50) erfolgt der Transport durch Bildung

hydrophiler Aggregate variablen Durchmessers, sogenannter Poren (51,52).

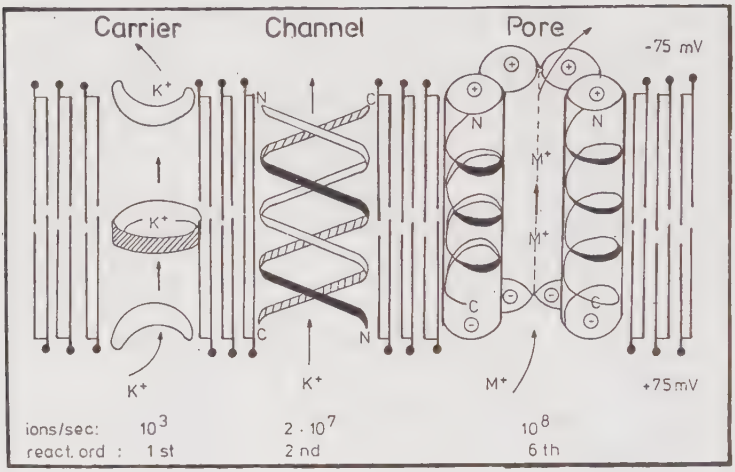


Abb. 1.1. Schematische Darstellung von Ionentransportmechanismen in einer Lipiddoppelschichtmembran

Notwendige Voraussetzung zu dieser Porenbildung sind Polypeptide mit etwa 20 Aminosäuren, von denen etwa 2/3 einen relativ starren α-helikalen, lipophilen N-Terminus und etwa 1/3 einen nicht-helikalen, polaren C-Terminus bilden müssen. Die von Jung et al. (53-55) experimentell gefundene α-Helix würde im Alamethicin mit 13 Aminosäuren von ^{2}Pro bis ^{14}Pro einen berechneten Makrodipol von ca. 65 D und 20 Å Länge ergeben. Experimentell wurden in Ethanol/Dioxan 1:3 67 D und in 1-Octanol 75 D für Alamethicin (56,57), sowie 50 D für Trichotoxin ermittelt (58). Alamethicin und Suzukacillin zeigen stabile Porenzustän-

de: Trichotoxin A-40 und ein synthetisches Nonadekapeptid (59) induzieren eine spannungsabhängige Leitfähigkeit, aber ohne stabile Poren. Die C-terminale Einführung (60) einer Dansylgruppe führt auch beim Trichotoxin A-40 zu Fluktuationen zwischen langlebigen Porenzuständen. Man erklärt sich die Wirkungsweise des Alamethicins so, daß sich aus an der Grenzfläche Wasser-Lipidmembran adsorbierten Alamethicin Molekülen Aggregate antiparalleler Dipole ausbilden (Abb.1.2.).

Legt man eine Potentialdifferenz über die Membran, so werden Übergänge von einem oder mehreren Molekülen in eine parallele Orientierung erfolgen. Dies induziert eine elektrostatische Abstoßung der Helices und die Bildung wassergefüllter Poren (Abb.1.2.e).

Die elektrochemischen Daten der Porenbildung stimmen mit diesem"Flip-Flop-Gating"-Modell (61) bis in kleinste Details überein.

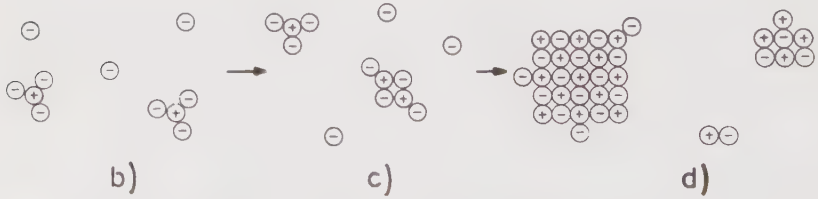
Die aus parallel angeordneten, sich abstoßenden Helices gebildete Pore füllt sich bevorzugt mit Wasser bzw. hydratisierten Ionen, da dieser Einfluß kooperativ wirkt. Die dielektrische und ionische Abschirmung reduziert die Abstoßkräfte um mindestens eine Größenordnung gegenüber einer mit Lipid gefüllten Pore. So entsteht ein Loch aus mehreren parallelen und kreisförmig angeordneten α-Helices. Die Pore besitzt einen variablen Durchmesser, da sie sich aus trimeren bis nonameren Aggregaten bilden kann.

Die Größe der Dipol-Aggregate wird beim Ruhepotential durch die thermische Bewegung bestimmt. Nach Anlegen der

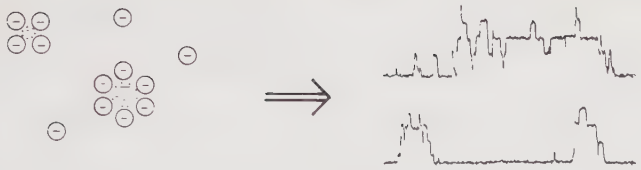
Spannung werden einige p-Dipole zu n-Dipolen, wobei kleine Aggregate instabil werden und größere nicht. Dies führt zu einer Verschiebung in Richtung Monomere und größerer Aggregate.

Abb.1.2. Schema der Membranporenbildung durch Alamethicin

a) Parallele Anordnung der α-Helixdipole nach Zugabe von Alamethicin von einer Membranseite(cis-Seite);rechts Aufsicht auf cis-Seite mit sich abstoßenden monomeren n-Dipolen. Das lipophile N-terminale α-Helix-Segment dringt in die Kohlenwasserstoffregion ein; die C-Termini wechselwirken mit den polaren Lipidköpfen.



Bildung verschiedener Aggregate aus alternierenden p,n Dipolen durch Umorientierung aus der parallelen in die energetisch günstigere antiparallele Anordnung.



e) Nach Spannungsanlegung (cis-Seite positiv) erfolgt in den Aggregaten (b,c,d) eine Parallel-Ausrichtung, Dipol-Abstossung und Porenbildung unter Ionendurchfluß. Unterschiedliche Leitwerte (rechts) beinhalten Porengrößenänderungen, die durch Hinzutritt oder Austritt von Monomeren induziert werden.

Diese Vorstellungen wurden kürzlich durch Ergebnisse von Bilayer-Untersuchungen an einfachen helikalen Polypeptiden Boc(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_n$OMe (n=1-4) unterstützt. Diese Sequenzpolymeren induzieren alle spannungsabhängige Ströme, wobei die dazu nötigen Peptidkonzentrationen mit zunehmender Peptidlänge kleiner werden (144).
Mit dem von H.Schmitt 1983 in hervorragender Reinheit hergestellten synthetischen Alamethicin F-30 (103) gelang es außerdem äußerst einheitliche Leitwerte ohne Sublevels zu erhalten, was weitere Detailuntersuchungen zum Mechanismus ermöglicht.

Erwähnt sei eine Reihe weiterer membranmodifizierender, vorwiegend lytischer Eigenschaften, die zum Teil nur am Alamethicin untersucht sind: Hämolyse von Human-und Tier-Erythrocyten (15-17,38,41,62,63), Lyse von Mäuse-Lymphocyten und Rattenmastzellen (17), Hemmung der DNS-Synthese

in Lymphocyten (17,64), Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung an Mitochondrien (64), Stimulation des Ionentransports durch Mitochondrienmembrane (65), sowie Stimulation der Guanylat-Cyclase von Paramecien (145).

1.3. Problemstellung

Alamethicin und die natürlichen Analoga Suzukacillin und Trichotoxin gehören zu den größten linearen Polypeptidantibiotika. Sie können spannungsabhängige ionenleitende Poren in künstlichen und natürlichen Lipidmembranen bilden. Aus der Untersuchung des molekularen Aufbaus und der Wirkungsweise dieses modellhaften Porensystems sind weiterführende Erkenntnisse über zelluläre Transportproteine zu erwarten. Vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Isolierung und Reinigung des membranmodifizierenden Analogons Suzukacillin sowie dessen Sequenzierung. Die besondere Problematik der Sequenzbestimmung von Alamethicin-Analoga besteht in der natürlichen Mikroheterogenität dieser Polypeptidantibiotika. Grund für diese ausgeprägte, die Reindarstellung und Sequenzierung sehr erschwerenden Mikroheterogenität ist die nach einem nicht-ribosomalen Mechanismus erfolgende Biosynthese an Multi-Enzym-Komplexen mit veringerter Spezifität (66-71). Vor der eigentlichen Sequenzierung sind daher präparative Isolierungen von nahe verwandten Partialsequenzen erforderlich, die z.B. durch selektive Trifluoracetolyse erhalten werden können. Enzymatische Partialhydrolysen können nicht durchge-

führt werden, da das Peptid gegen die verschiedensten Peptidasen völlig resistent ist (11). Dies dürfte auf den ungewöhnlich hohen Gehalt an α-Aminoisobuttersäure (Aib) zurückzuführen sein. Aib behindert einen Angriff durch Hydrolasen auf die Peptidbindung wegen der geminalen Methylgruppen sterisch (72).

Mit den isolierten Partialsequenzen sollten CD-, C-13-NMR- sowie GC-MS - Untersuchungen durchgeführt werden, um Sequenzlänge und Austauschpositionen der 1976 allein auf Grund von GC-MS gefundenen und als vorläufig bezeichneten Suzukacillinsequenz zu korrigieren und abzusichern.

Die Tatsache, daß wir nur über geringe Mengen Suzukacillin A verfügten und keinerlei Nachisolierung möglich war, erforderte bei allen Reinigungs-, Mess- und Reaktionsschritten das Arbeiten mit minimalsten Konzentrationen.

Herrn Dr. Tadaaki Ooka, Technical Research Laboratory, Asahi Chemical Industry Co., Ltd. 2-1 Samejima, Fujishi, Shizuoka (Japan), danke ich für die Überlassung der Suzukacillin Probe.

2. Kultur und Isolierung von Suzukacillin A und B

1965 isolierten T. Ooka et al. (1) aus Bodenproben von Suzuka (Japan) einen Pilz, welcher ein antibakterielles Peptid produzierte und als Trichoderma viride strain 63 C-I klassifiziert wurde. Die Zucht von Trichoderma viride erfolgte im 500 ml Schüttelkolben in je 50 ml Nährlösung (4 proz. Stärke, 1 proz. Polypepton, 0,05 proz. KH_2PO_4, 0,3 proz. NaCl, 0,05 proz. $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ und 0,2 proz. $CaCO_3$) und lieferte eine Ausbeute von 8,5 g Suzukacillin pro Liter, welches dünnschichtchromatographisch aus einer Hauptkomponente A und einer weiteren Komponente B bestand. Beide Substanzen hemmten das Wachstum von Bacillus subtilis. Isolation und Aufreinigung sind in Abb. 2.1. dargestellt.

2.1. Reinigung des Rohextraktes

5,1 g des obigen Rohextraktes wurden uns freundlicherweise von T. Ooka, Ashai Chemical Industry Co.,Ltd., Japan zur Verfügung gestellt. Diese Rohware enthielt sowohl Suzukacillin A als auch kleinere Mengen Suzukacillin B. Zur Abtrennung von Suzukacillin B wurde der Rohextrakt in heißem Chloroform mit wenig Aceton gelöst und durch Zugabe von Aceton Suzukacillin A auskristallisiert. Die Ausbeute an Suzukacillin A betrug 2,7 g. Das Produkt aus farblosen hexagonalen Kristallen ist dünnschichtchromatographisch einheitlich und schmilzt bei 259-261 °C. Alle im folgenden beschriebenen Experimente wurden mit der Hauptkomponente Suzukacillin A ausgeführt.

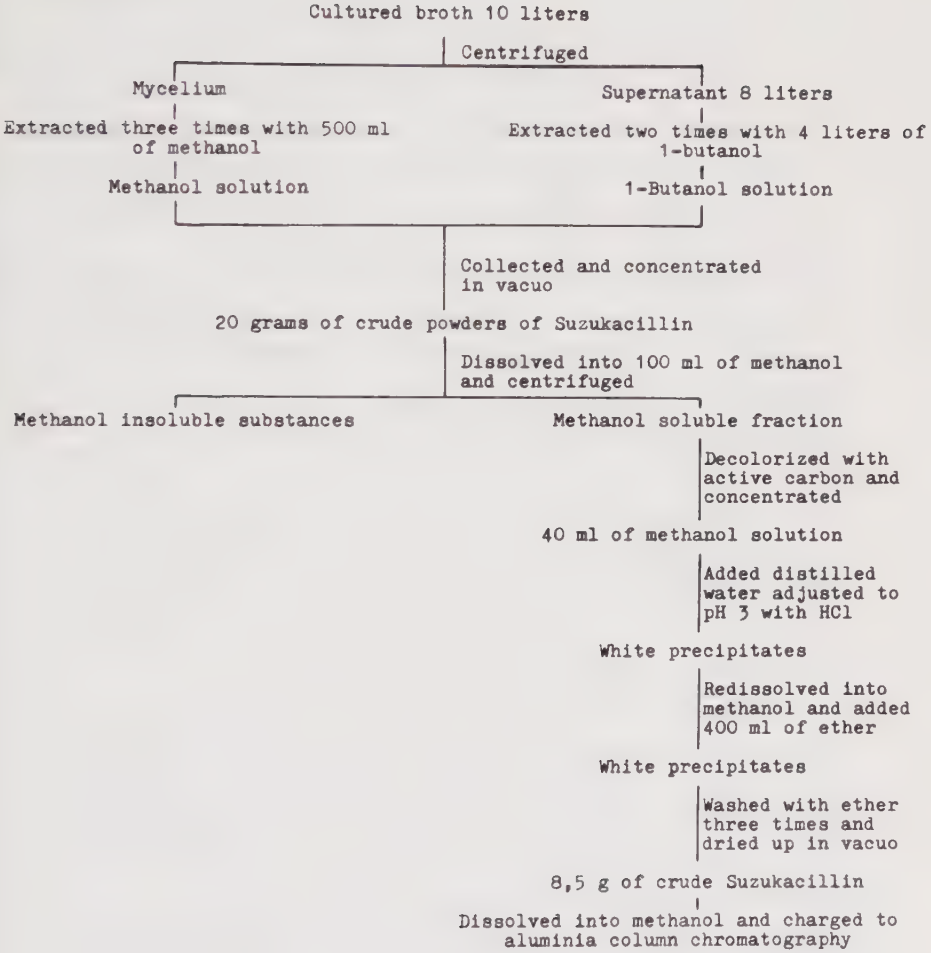


Abb. 2.1. Isolierung und Reinigung von Suzukacillin A und B aus Trichoderma viride (63 C-I) nach T. Ooka et al. (1).

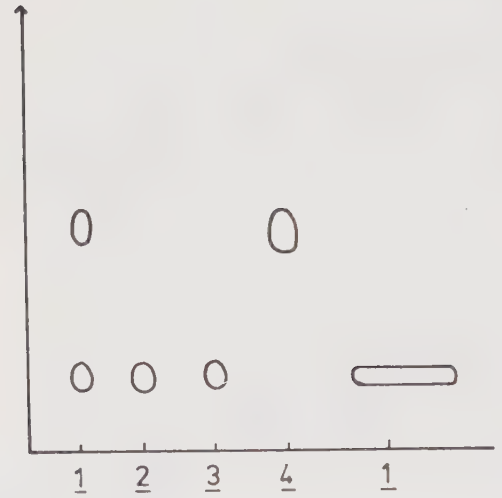


Abb. 2.2 Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Trennung von Suzukacillin A und B. (System VII, Sprühreagens H_2O, Lösung von Suzukacillin A/B 0,5 %)

1 Rohware
2 Rohware aus $CHCl_3$/Aceton
3 Suzukacillin kristallin
4 Suzukacillin B

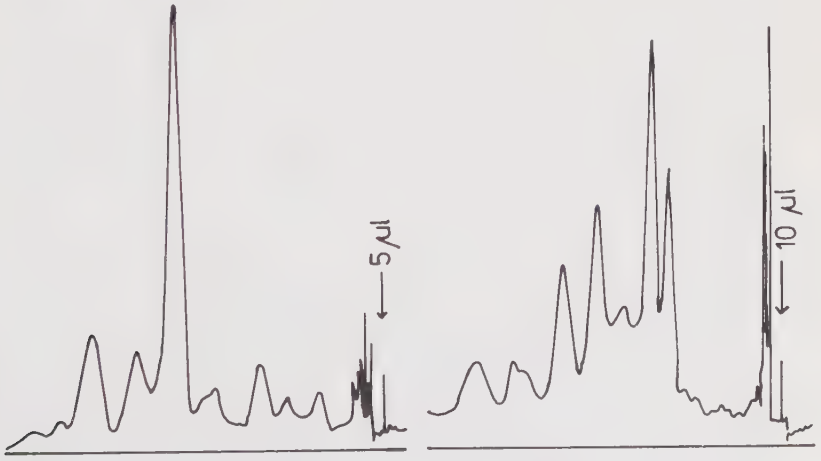
3. Charakterisierung von Suzukacillin A, Bestimmung von C- und N-Terminus

3.1. Aminosäurenbestimmung

Frühere Untersuchungen (87) an Suzukacillin A und Alamethicin ergaben keine Hinweise auf andere Atome als C,H,O und N, außer Spuren von Na^+, Cl^- und SO_4^{2-} im für biologische Materialien üblichen Umfang.

Für Suzukacillin A war 1965 folgende Aminosäurenzusammensetzung gefunden worden: Glu (1,94),Pro (0,72), Gly (0,84), Ala (2,22), Val (0,94), Leu(0,71), Ile (0,25),a-Ile (0,03) und 0,95 einer unbekannten ninhydrin-positiven Substanz (1). Die unbekannte Aminosäure wurde durch Infrarot- und NMR-Spektren als α-Aminoisobuttersäure (2-Methylalanin) identifiziert (3).

Eine 1975 durchgeführte kombinierte GC-MS Analyse (6) von trifluoracetylierten Peptidmethylestern eines Partialhydrolysates ergab eine vorläufige Sequenz mit 23 Aminosäuren, die 10 α-Aminoisobuttersäuren und ein Phenylalaninol enthielt. Die Aminosäurenanalyse auf dem Biotronik-Aminosäurenanalysator lieferte folgende Aminosäurenzusammensetzung: 1 Leu,1 Val, 8-9 Aib, 2-3 Ala, 1 Gly, 1 Pro, 3 Glu und Spuren von Ile. Wiederum ergab sich jedoch bei einigen Aminosäuren keine ganzzahlige Stöchiometrie. Suzukacillin zeichnet sich wie Alamethicin und Trichotoxin durch eine Mikroheterogenität aufgrund eines Austausches von Aminosäuren aus. Sowohl bei der gereinigten, isolierten Suzukacillin Probe als auch bei reinem isoliertem Alamethicin konnten durch HPLC ca. 6-8 Komponenten festgestellt werden. In der Rohware (Abb.3.1.) sind noch weitere Komponenten enthalten.



Alamethicin Rohware Suzukacillin Rohware

Abb. 3.1. HPLC an µ-BONDAPAK C-18 von Alamethicin und Suzukacillin(Methanol,Wasser,Isopropanol 68:22:10)

Auch bisher nicht gefundene Komponenten waren in Betracht zu ziehen, da im 13-C-NMR Spektrum bei 7 ppm ein den oben erwähnten Aminosäuren nicht zuordenbares Signal auftritt. Die in Antimoebin und Emericin vorhandene seltene Aminosäure Isovalin gibt zum Beispiel ein Signal in diesem Bereich.

3.1.1. Qualitative Aminosäurenanalyse und Konfigurationsbestimmung durch Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GC-MS)

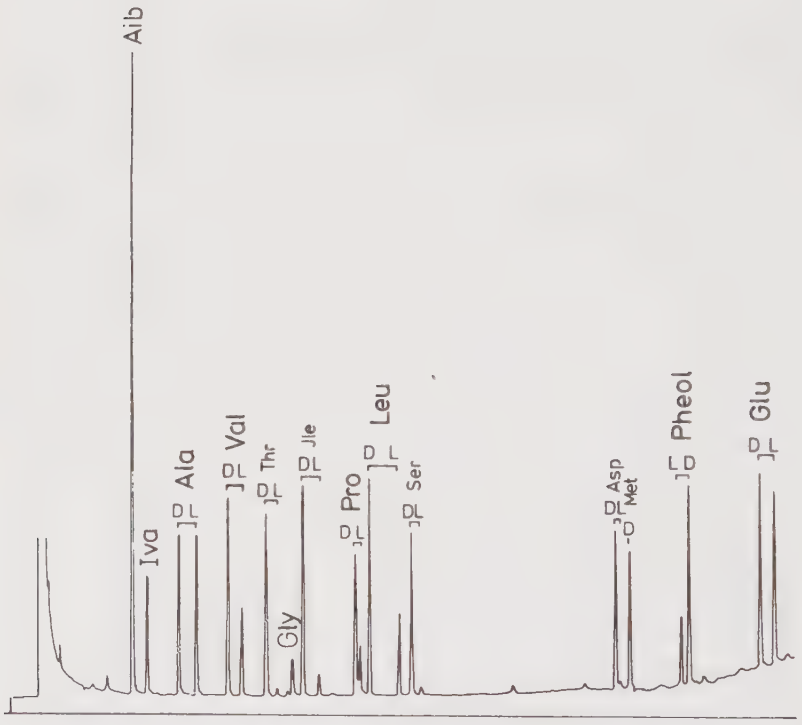
Die durch Totalhydrolyse des Suzukacillins A erhaltenen Aminosäuren wurden mit n-Propanol/2 N HCl verestert und mit Pentafluorpropionsäureanhydrid bei 110 ^{o}C in Methylenchlorid acyliert. Durch anschließende Gaschromatographie an einer Chirasil-Glaskapillarsäule wurden Aib, Iva, Ala, Val, Gly, Pro, Leu, Pheol, Glu und Spuren von Ile identifiziert(90,91). Das im Gegensatz zu den anderen Aminosäuren vergleichsweise kleine Flächenintegral von Isovalin ist, wie schon beim Trichotoxin A-40 gefunden (88), in einem Vorliegen von weniger als einem Äquivalent Isovalin begründet. Zudem ist die durch sterische Hinderung bedingte Derivatisierungsausbeute und die Leichtflüchtigkeit des Isovalinderivates zu beachten (Abb. 3.2.).
Zur Ermittlung der Konfiguration der Aminosäuren wurde die Gaschromatographie an chiralen Phasen herangezogen (89). Die Trennung der N-Pentafluorpropionylaminosäure-n-propylester erfolgte an der chiralen Phase L-Valin-tert.-butylamid-polysiloxan (Chirasil-Val) (90,91). Durch Vergleich mit Testmischungen von Aminosäuren bekannter Konfiguration

(D-Standard) konnte die L-Konfiguration von Glu, Pro, Ala, Leu, Ile und Val ohne Schwierigkeiten bestimmt werden (Abb. 3.3.).

Abb. 3.2. Gaschromatogramm der N-Pentafluorpropionyl-aminosäure-n-propylester bzw. N,O-Bis-pentafluorpropionyl-phenylalaninol eines Totalhydrolysates von Suzukacillin A.

Bedingungen: Carlo Erba Gaschromatograph 2100; Glaskapillarsäule Chirasil-Val; Trägergas H_2; Druck 0,4 kg/cm^2; Temperaturprogramm 3 °C/min bis 80 °C, 4 °C/min bis 200 °C; Einspritzung 8 µl; Detektor FID.

Abb. 3.3. Gaschromatogramm der N-Pentafluorpropionylaminosäure-n-propylester bzw. N,O-Bis-pentafluorpropionylpheol eines Totalhydrolysates von Suzukacillin A mit zugesetzter Testmischung von D-Aminosäuren.
Bedingungen wie Abb. 3.2.



Die Bestimmung der D-Konfiguration des Isovalins in Suzukacillin A und B sowie verwandten Peptidantibiotika wurde schon 1980 (88,92) in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Dazu wurde aus synthetischem D,L-Isovalin (90) das L-Enantiomere über den N-Benzoyl-1-menthylester isoliert (94). Möglich

ist auch die Trennung des Isovalin-Racemats durch Desacylierung von Chloracetyl-D,L- sovalin mittels Acylase I aus Schweinenieren. Nach Bildung des Diastereomeren durch Veresterung mit (+)-3-Methyl-2-butanol und Acylierung mittels Pentafluorpropionsäureanhydrid wurden die Retentionszeiten auf einer mit OV 17 belegten Glaskapillarsäule bestimmt (95). Dabei zeigte das (S)(+)-Diastereomere eine längere Retentionszeit als das (R)(+)-Diastereomere. Durch Vergleich konnte dem Isovalin im Totalhydrolysat der Peptidantibiotika Trichotoxin A-40, Suzukacillin A und B, Antiamoebin, Stilbellin und Samarosporin die R-Konfiguration ((-)-D-Isovalin) zugeordnet werden.

Überraschend wurde kürzlich von Bullough et al. L-Isovalin in den Efrapeptinen (132) gefunden. Wir konnten dies an einer uns überlassenen Probe bestätigen.

Bei der Trennung von Trifluoracetylaminosäure-n-propylestern auf der optisch aktiven Phase Chirasil-Val an Glaskapillaren bei niedriger Säulentemperatur läßt sich eine gute Trennung von D- und L-Isovalin sowie eine Abtrennung von Aib und anderen Komponenten erhalten, wobei auch hier das D-Enantiomere vor dem L-Enantiomeren eluiert wird. Im Gegensatz zu Suzukacillin B zeigte Suzukacillin A weniger als 0,5 Äquivalente Isovalin, ein weiterer Hinweis auf die Mikroheterogenität des Peptids.

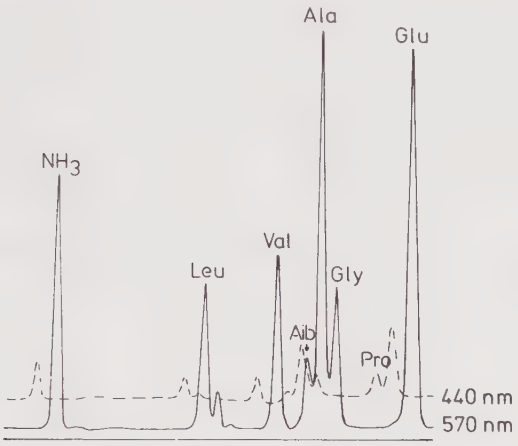
3.1.2. Quantitative Aminosäurenanalyse durch Ionenaustauscherchromatographie

Außer Isovalin und Phenylalaninol konnten auf dem Biotronik-Aminosäurenanalysator alle durch Totalhydrolyse des Suzukacillins erhaltenen Komponenten getrennt werden. Die vergleichsweise geringe Farbausbeute der α-Aminoisobuttersäure mit Ninhydrin (6 % der Leucin-Fläche) war schon bei der Sequenzierung von Alamethicin und Trichotoxin aufgefallen und hatte früher zur Ermittlung viel zu niederer Aib-Werte geführt. Um eine quantitative Aminosäurenanalyse zu erhalten wurde eine Aib-Testmischung hergestellt und bei jeder Aib Bestimmung als Vergleich eingespritzt.
Isovalin wird an derselben Stelle wie Valin eluiert, wobei es, bedingt durch seinen sehr schwachen Anfärbefaktor (5% der Leu-Fläche) nur einen leicht erhöhten Valinwert verursacht. Hydrolysezeiten von 18, 33 und 48 h zeigten keine Veränderungen des Chromatogramms. Die Aminosäurenanalyse für Suzukacillin A ergab folgende Werte:

Leu 1,01 Val 1,23 Aib 9,15 Ala 2,65 Gly 1,0
Pro 1,05 Glu 3,2[x]

[x]Die Aminosäureanalyse lieferte bei allen Proben und Testmischungen leicht überhöhte Glu-Werte.
Die Untersuchungen ließen auf ein Peptid mit 19 Aminosäuren und einem Phenylalaninol folgender Zusammensetzung schließen: Leu_1, Val_1, Aib_9, Ala_3, Gly_1, Pro_1, Glu_3. Die Untersuchung von Partialhydrolysaten zeigte jedoch, daß die teilweise Nichtstöchiometrie auf Austausch von Ala gegen Aib, Aib gegen Iva und Leu gegen Aib zurückzuführen ist.

Abb. 3.4. Chromatogramm eines Totalhydrolysates von Suzukacillin A;(Hydrolyse 18 h, 110°C, 6 N HCl; Biotronik - Aminosäurenanalysator LC 6000 E, Ninhydrin-Anfärbung)



3.1.3. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Zur Überprüfung der Aminosäurenanalyse wurde eine zweidimensionale Dünnschichtchromatographie eines Totalhydrolysates von Suzukacillin A auf Kieselgelplatten durchgeführt. Als zur Trennung der vorhandenen Aminosäuren geeignet erwiesen sich System VI (1. Dimension) und System V (2. Dimension). Zum Vergleich wurden die in Suzukacillin A durch Aminosäurenanalyse und Gaschromatographie identifizierten Aminosäuren mit aufgetragen. Phenylalaninol war in der aufgetragenen Konzentration nicht mit Ninhydrin nachweisbar. Der Aminoalkohol konnte jedoch in System VI durch strichförmiges Auftragen der 5-fachen Konzentration eindeutig nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit den bisherigen Analysenmethoden wurden als Komponenten gefunden:

Leu, Val (Iva), Aib, Ala, Gly, Pro, Glu, Pheol.

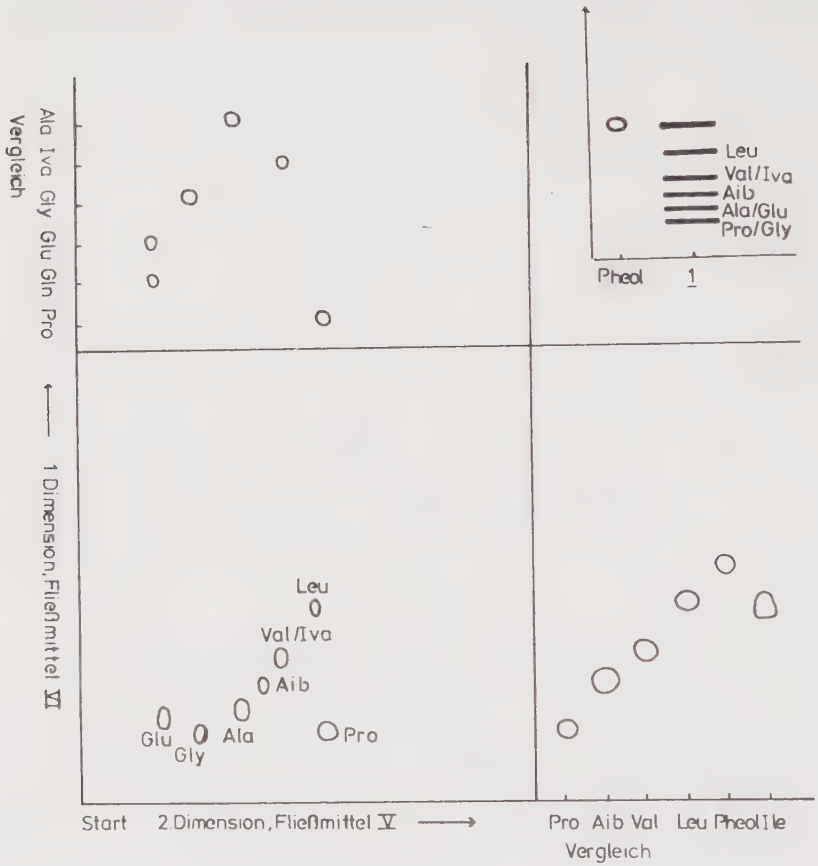


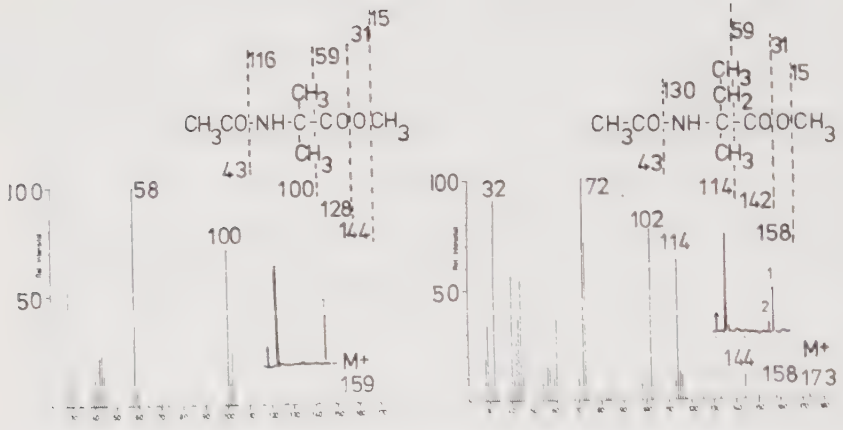
Abb. 3.5. Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm der Aminosäurenmischung des Totalhydrolysates von Suzukacillin A. Aufgetragen: 1 µl einer 1 proz. Lösung (Aib 10 proz. Lösung), Laufstrecke 11,3 cm; Nach Entwicklung in der ersten Dimension wird 20 min bei 110°C getrocknet. Fließmittel VI = 1-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 (v/v), Fließmittel V = Phenol/Wasser 75:25 (g/g) (96).

Dünnschichtchromatogramm eines Totalhydrolysates 1 von Suzukacillin A (System VI) im Vergleich zu synthetischem Phenylalaninol.

3.2. Nachweis von Ac-Aib-OH in Suzukacillin A und Ac-Iva-OH in Suzukacillin B.

Nachdem die Abwesenheit einer freien N-terminalen Aminogruppe im Alamethicin von Payne et al. (1970) (11) und Ovchinnikov et al. (1971) (12) durch eine cyclische Struktur erklärt wurde und diese durch Martin und Williams (1975) (13) aufgrund 270 MHz ^{1}H-NMR Messungen zugunsten einer linearen Struktur mit N-terminalem Ac-Aib-OH revidiert wurde, bestätigte 1977 Pandey et al. (19) durch Elektronenstoßmassenspektroskopie die Blockierung des N-Terminus durch N-Acetyl-α-aminoisobuttersäure. Schon 1977 wurde in unserem Arbeitskreis versucht (17) durch vorsichtige Hydrolyse die für Alamethicin F-50 und Suzukacillin postulierte Endgruppe N-Acetyl-Aib-OH selektiv abzuspalten.
Es gelang, durch die Einwirkung von wasserfreier Trifluoressigsäure die sehr säurelabilen N-terminalen Ac-Aib-X Bindungen (insbesondere bei Ac-Aib-Pro-) zu trennen und das abgespaltene Ac-Aib-OH durch Dünnschichtchromatographie direkt aus dem Partialhydrolysat mittels Vergleichsmaterial durch Anfärben mit Chlor/o-Tolidin oder TDM-Reagens (96) zu identifizieren (88). Zur Unterscheidung von ähnlich laufenden Spaltprodukten wurde N-Acetyl-Aib-OH mit Diazomethan verestert und dünnschichtchromatographisch mit synthetischem Ac-Aib-OMe verglichen.
Weiterhin wurde der N-Acetyl-α-Aminoisobuttersäuremethylester durch kombinierte GC-MS in Alamethicin, Trichotoxin A-40 und Suzukacillin A und B bestimmt. N-Termini wie

Formyl-Aib-OMe und Propionyl-Aib-OMe konnten ausgeschlossen werden (88).



1 2

Abb. 3.6.

1 Gaschromatogramm und Massenspektrum des aus Suzukacillin A erhaltenen N-Acetyl-α-aminoisobuttersäure-methylesters (88).

2 Massenspektrum des aus Suzukacillin B erhaltenen N-Acetyl-D-isovalin-methylesters, (Peak 2 im Gaschromatogramm, Peak 1 ist Ac-Aib-OMe) das auch dem Massenspektrum von synthetischem N-Acetyl-DL-isovalin-methylester entspricht (88).

In Suzukacillin B werden neben Ac-Aib-OMe etwa 20 % einer sich ähnlich verhaltenden, trifluoracetolytisch abspaltbaren und gaschromatographisch von Ac-Aib-OMe abtrennbaren Verbindung der Massenzahl m/e=173 (M^+) gefunden. Diese Verbindung konnte durch Vergleich der Retentionszeit und Fragmentierungsmuster mit synthetischem Ac-Iva-OMe als solche

charakterisiert werden (88). In Suzukacillin B ist somit Ac-Aib-Oh zu ca. 20 % gegen Ac-Iva-OH ausgetauscht.

3.3. Bestimmung der Position von Glutamin und Glutaminsäure

Wichtig für die Sequenzierung des Suzukacillin A war ein nach dessen Trifluoracetolyse isoliertes Gemisch zweier C-terminaler N-Prolylpeptide, deren Sequenzen zunächst als Pro-Val-Aib-Aib(Iva)-Glx-Glx-Pheol bestimmt wurden. Das Totalhydrolysat von Suzukacillin A enthält drei Mol Glutaminsäure pro Mol Suzukacillin A. Weil die Säureamidgruppen von möglicherweise vorhandenem Glutamin unter den angewandten Hydrolysebedingungen (6 N HCl, 18 h, 110 °C) quantitativ verseift werden, treten in den Hydrolysaten die entsprechenden Glutaminsäurewerte auf. Eine sichere quantitative Auswertung über den NH_3-Gehalt war nicht möglich, da selbst Gln freie Partialsequenzen einen NH_3-Peak ergaben. Somit wurde die Sequenz Glx-Glx aus dem Partialhydrolysat von Suzukacillin A massenspektroskopisch untersucht. Es boten sich dazu zwei Wege der Derivatbildung an: Sowohl das durch Acetylierung, Reduktion mit B_2H_6 und Trimethylsilylierung erhaltene Produkt als auch der N-Trifluoracetyl-glutamyl-γ-ethylester-α-2-cyano-L-glycinethylester zeigen bei massenspektrometrischer Untersuchung für Glu-Gln typische sequenzbestimmende Ionen. Daher wurde zunächst für das Dipeptid Glx-Glx die Sequenz Glu-Gln angenommen.

Bei der Dünnschichtchromatographie des aus Suzukacillin A isolierten C-Terminus im Vergleich zu dem von H.Schmitt (103) synthetisierten Alamethicin C-Terminus Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol stellte sich heraus, daß die beiden C-Termini in alkalischen DC-Laufmitteln unterschiedliche R_F-Werte aufwiesen.
(Abb. 3.7.).
Da eine Differenzierung zwischen Glu-Gln und Gln-Gln weder ^{13}C-NMR spektroskopisch noch im CD-Spektrum möglich ist, wurde auch das Prolylheptapeptid Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol synthetisch hergestellt. Dieses Syntheseprodukt erwies sich in den DC-Laufmitteln I bis III als identisch mit dem aus Suzukacillin A isolierten Prolylheptapeptid (Abb. 3.7., Tab. 4.1.)
Die massenspektrometrisch ermittelte nicht zutreffende Teilsequenz Glu-Gln ist möglicherweise unter den angewandten Hydrolyse- und Derivatisierungsbedingungen entstanden. Interessanterweise geben auch sämtliche ungeschützten Gln-Derivate, die zur Synthese eingesetzt wurden, bei Raumtemperatur ninhydrinnegative Nebenprodukte.

Abb. 3.7. DC in $CHCl_3$/Methanol/17% NH_3 70/35/10, selektive Anfärbung der Prolinpeptide mit Isatin

1) synthetisches Alamethicin F30 Partialhydrolysat

2) Alamethicin F50 Partialhydrolysat

3) Suzukacillin A Partialhydrolysat

4) Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol (Iva) aus SZ A isoliert

5) Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol synthetisch

6) Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol synthetisch

Das fehlende dritte Mol Glutaminsäure pro Mol Suzukacillin A konnte im Massenspektrum der N-terminalen Sequenz (2-13) als Glutamin identifiziert werden (Abschnitt 4.3.2.).

Besonders typisch für Glutamin ist hier das Auftreten der Massenzahlen 499 und 513, beide weichen um eine Masseneinheit vom eigentlich zu erwartenden Fragmention 500 bzw. 514 ab. Diese Reduktion der Sequenzionen um jeweils eine Masseneinheit ist typisch für Glutamin[x].

3.4. Nachweis von L-Phenylalaninol

Der C-terminale Aminoalkohol Phenylalaninol konnte durch dünnschichtchromatographischen Vergleich mit synthetischem Phenylalaninol nachgewiesen werden. Die peptidische Verknüpfung über die Aminogruppe des Aminoalkohols in den Prolylpeptiden ergab sich aus der Nichtanfärbbarkeit des Suzukacillin A mit Ninhydrin. Bei einer Esterverknüpfung des Phenylalaninols mit der Carboxy-Gruppe des Glutamins müßte eine freie Aminogruppe anfärbbar sein.
Zur Konfigurationsermittlung des Aminoalkohols bot sich die Gaschromatographie an chiralen Phasen an (89). Eine Probe des C-terminalen Prolylpeptides wurde mit 6 N HCl bei 110°C 18 h hydrolysiert, das Phenylalaninol im getrockneten Hydrolysat mit Pentafluorpropionsäure N,O-acyliert und zusammen mit einer Standardlösung aus synthetischem Phenylalaninol chromatographiert.
Die Trennung des so erhaltenen N,O-bis-Pentafluorpropionylphenylalaninol erfolgte an Quarzkapillaren belegt mit der chiralen Phase L-Valin-tert.-butylamid-polysiloxan (Chirasil-Val)(90,91). Dabei wird der L-enantiomere Aminoalkohol

[x]Mitteilung von Prof. Dr. W.A. König, Universität Hamburg

vor dem D-enantiomeren eluiert, während bei α-Aminosäurederivaten dagegen das D-Enantiomere vor dem L-Enantiomeren eluiert wird (Abb. 3.8.).

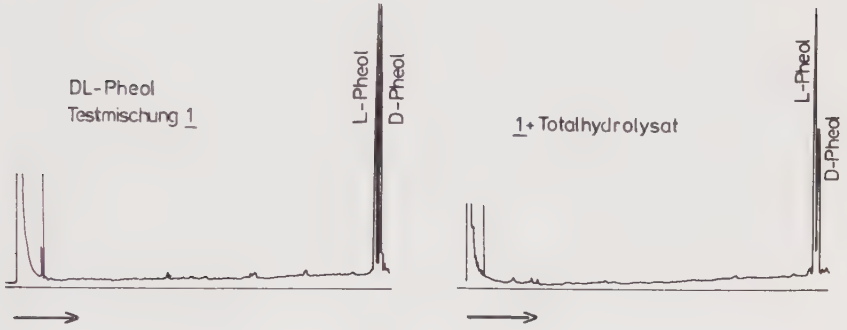


Abb. 3.8. Gaschromatographische Bestimmung von L-Phenylalaninol im Totalhydrolysat von Pro-Val-Aib-Aib(Iva)-Glu-Gln-Pheol und einer Standardlösung von D,L-Phenylalaninol 1.

4. Sequenzierung

4.1. Sequenzierungsstrategie und Säurelabilität

Bei der Aufklärung der Primärstruktur eines Peptids wird man an erster Stelle versuchen, die Aminosäurenkette in zunächst größere Bruchstücke zu zerlegen. Da sich jedoch die Peptidantibiotika dieser Verbindungsklasse durch Blockierung der N-Termini durch einen Acetylrest und der C-Termini durch einen Aminoalkohol auszeichnen, sind Sequenzierungsmethoden, die freie N- bzw. C-Termini voraussetzen, nicht möglich. Sequenzierungen wie Edman-Abbau (97), wasserfreies Hydrazin (98), Dansylierung (99) oder Endgruppenbestimmung mit

2,4-Dinitrofluorbenzol (100) können erst nach vorhergegangener Spaltung des Moleküls angewandt werden. Wie auch schon am Alamethicin gezeigt werden konnte (11), sind Peptide mit hohem Aib-Gehalt gegen enzymatische Abbaumethoden völlig resistent.

Die Methode, die sich bei Sequenzierungen in dieser Verbindungsklasse schon bewährt hatte (6,12,19,27,33,47), war die kombinierte Gaschromatographie-Massenspektroskopie[x].

Schon früher durchgeführte Acidolysen mit konzentrierter wässriger Salzsäure (11,12,14,19) führten zu keiner befriedigenden Sequenzierung beim Trichotoxin, da nur Di-, Tri- und Tetrapeptide erhalten werden konnten. Die Notwendigkeit, Trichotoxin in längerkettige Oligopeptide zu spalten, führte zur Ausarbeitung einer vorwiegend Aib-Pro - und andere Aib-Aminosäure-Bindungen selektiv spaltenden Methode mit wasserfreier Trifluoressigsäure (88). Diese Methode konnte auch zum Nachweis von N-terminalem Ac-Aib-OH angewandt werden. Diese selektive Acidolyse erlaubte auch beim Suzukacillin die präparative Gewinnung reiner Partialfragmente und die positionsmäßige Festlegung der Mikroheterogenität. Mit einem Fließmittelsystem ($CHCl_3$/MeOH/H_2O/AcOH 65:25:4:3), welches alle durch Acidolyse entstandenen Spaltprodukte zu trennen vermochte, konnte der Reaktionsverlauf dünnschichtchromatographisch verfolgt werden. Durch Verwendung spezieller

[x]Sehr herzlich sei an dieser Stelle Herrn Prof. W. A. König und seinen Mitarbeitern, Universität Hamburg, für diese Untersuchungen sowie die ausgezeichnete Zusammenarbeit gedankt.

Sprühreagentien konnten zusätzliche Aussagen getroffen werden. Mit Isatin (78) wurden mit N-terminalem Prolin beginnende Sequenzen sichtbar gemacht; mit Ninhydrin (101) wurden Peptide mit freier Aminogruppe und durch 4,4-Tetramethyldiaminodiphenylmethan (TDM) (79) allgemein CO-NH - Bindungen detektiert.
Die durch Acidolyse entstandenen Oligopeptide mußten isoliert werden. Ihre Sequenzen mußten aus Partialhydrolysaten nach Veresterung mit Salzsäure in Methanol und anschließender Trifluoracetylierung mit Trifluoressigsäureanhydrid durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie bestimmt werden.

4.1.1. Selektive Trifluoracetolyse von Suzukacillin A

Um geeignete Spaltbedingungen herauszufinden, wurden an Suzukacillin A zeitabhängige Acetolysen durchgeführt, und die Spaltprodukte dünnschichtchromatographisch mit Fließmittel I untersucht. Strichförmiges Auftragen der Proben ergab die beste Trennung. Detektiert wurde mit Wasser, Ninhydrin, Isatin und TDM.

a) Isatin

Schon nach 30 min zeigte sich eine mit Isatin blaufärbende Substanz, was auf eine Sequenz mit N-terminalem Prolin schließen ließ. Sie wurde später als Pro-Val-Aib-Aib(Iva)-Glu-Gln-Pheol identifiziert. Durch die höhere Konzentration dieser Partialsequenz bei zunehmender Hydrolysedauer ließen sich die beiden Sequenzisomeren auch dünnschichtchromato-

graphisch trennen (Abb. 4.1.). Nach drei Stunden konnte das Auftreten einer weiteren Sequenz mit N-terminalem Prolin beobachtet werden, welche ebenfalls aus zwei nahe beieinanderlaufenden Komponenten bestand. Diese wurde als Pro-Val-Aib-Iva(Aib) charakterisiert.

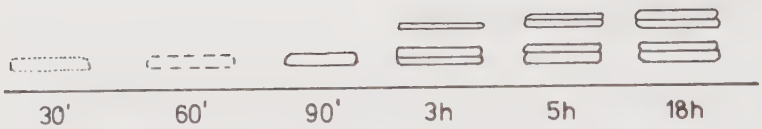


Abb. 4.1. Dünnschichtchromatogramm der zeitabhängigen Trifluoracetolyse (37°C, 1mg) von Suzukacillin A: Nach Anfärbung mit Isatin blau erscheinende Fragmente mit N-terminalem Prolin (Fließmittel -System I).

b) Ninhydrin

Außer den mit Ninhydrin gelb anfärbenden N-Prolylpeptiden zeigten sich zusätzlich eine Anzahl violettroter, zum Teil rotoranger Flecke, was auf Peptide mit freien N-terminalen Aminosäuren verwies. Später konnte gezeigt werden, daß vor allem das Tripeptid Gly-Leu-Aib eine für Ninhydrin typische gelborange Anfärbung besitzt. Auffallend war, daß die mit Ninhydrin rot anfärbbaren Komponenten nicht im selben Maße zunahmen wie die mit Ninhydrin gelb anfärbbaren. Einerseits

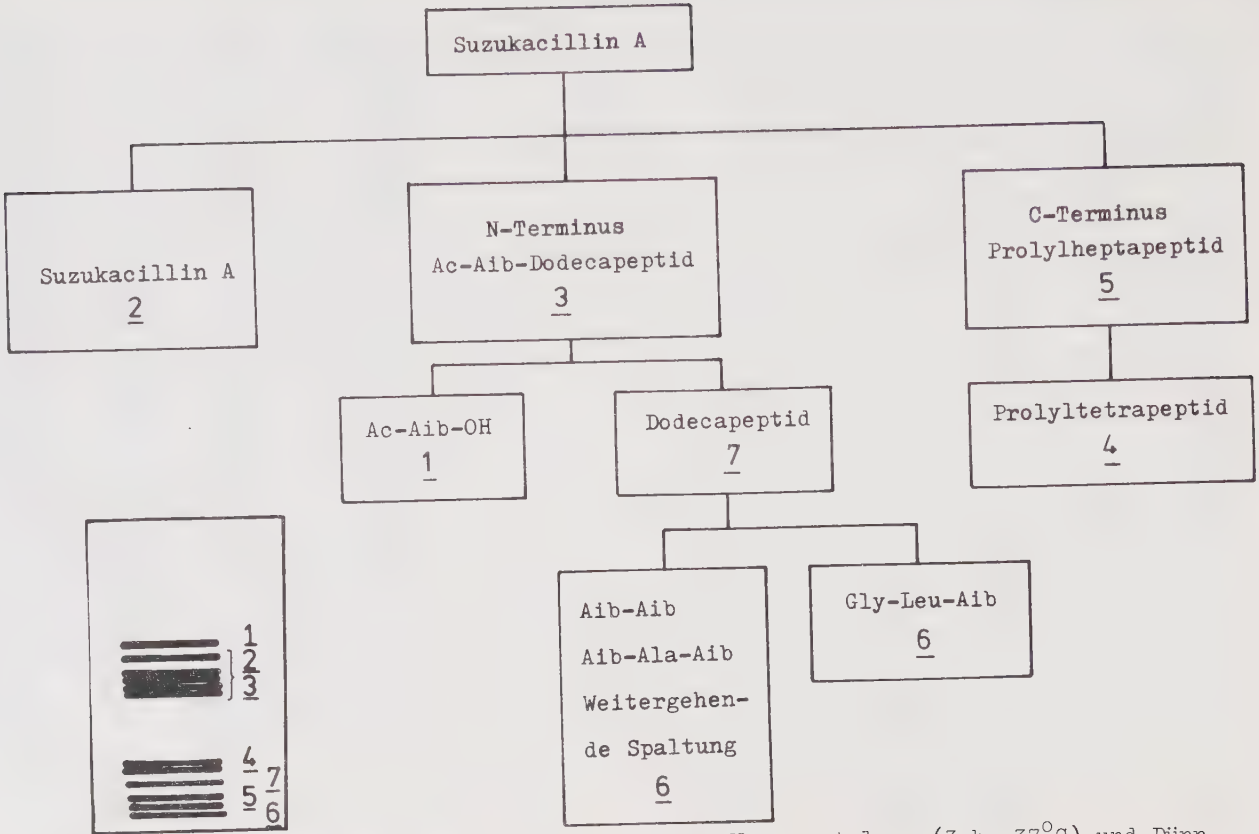


Abb. 4.2. Spaltschema von Suzukacillin A nach Trifluoracetolyse (3 h, 37°C) und Dünnschichtchromatogramm der Spaltprodukte in Fließmittelsystem I.

weil mit N-terminalem Aib beginnende Peptide mit Ninhydrin sehr viel schwächer als üblich anfärben, und andrerseits die N-terminale Ac-Aib↓-Ala Bindung und die C-terminale -Aib↓-Pro- Bindung unterschiedliche Säurelabilität aufweisen. Wie schon beim Trichotoxin und Modellpeptiden festgestellt wurde, ist die 50 proz. Spaltung der Ac-Aib↓-Pro Bindung nach weniger als 15 min erreicht, während bei Ac-Aib↓-Ala erst nach 3 h eine 50 proz. Spaltung vorliegt (88). Auf Grund dieses Hydrolyseverhaltens entstehen als Spaltprodukte des Suzukacillins zuerst die C-terminalen Prolylpeptide und N-acetylierte, nicht mit Ninhydrin anfärbbare N-terminale Oligopeptide (Abb. 4.3.).

Abb. 4.3. Dünnschichtchromatogramm der zeitabhängigen Trifluoracetolyse (37°C, 1 mg) von Suzukacillin A: Ninhydrin-Anfärbung, Fließmittelsystem I.

c) TDM (4,4-Tetramethyldiaminodiphenylmethan)

Eine Blau-grün - bis Dunkelbraunfärbung mit TDM zeigte die Abnahme des Ausgangsmaterials und das gleichzeitige Auftreten von Ac-Aib-OH an. Durch Abspaltung der Prolylpeptide vom

Gesamtpeptid entstehen N-acetylierte Oligopeptide, die mit TDM sichtbar werden.

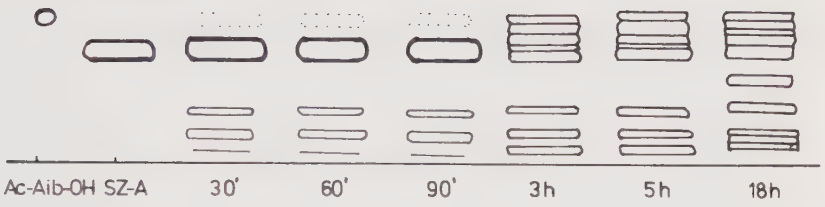


Abb. 4.4. Dünnschichtchromatogramm der zeitabhängigen Trifluoracetolyse (1 mg, 37°C) von Suzukacillin A: gezeigt werden die mit TDM anfärbbaren Fragmente (System I).

d) Wasser

Durch Detektion mit Wasser konnten die Ausgangssubstanz Suzukacillin A und längerkettige lipophile Partialsequenzen nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde beschlossen, eine präparative Trifluoracetolyse durchzuführen. Da von den entstehenden Produkten als erstes die C-terminale Prolylsequenz isoliert werden sollte, erschien eine dreistündige Partialhydrolyse am sinnvollsten, da sich bei längerer Einwirkung von Trifluoressigsäure die mit Ninhydrin gelb anfärbbare Prolylsequenz weiter hydrolysierte und auch wesentlich mehr mit Ninhydrin rot anfärbbare Produkte entstanden. Die Spaltprodukte waren präparativ chromatographisch zu trennen und separat zu sequenzieren, um so zu einer ein-

deutigen Primärstruktur zu gelangen. Beim Versuch, den C-Terminus präparativ zu isolieren, erwies sich jedoch die innerhalb von drei Stunden abgespaltene Menge an Prolylpeptid für weitere Untersuchungen als zu gering. Um Spaltprodukte in höherer Ausbeute isolieren zu können, wurde ein weiterer Trifluoracetolyse-Ansatz von achtstündiger Dauer durchgeführt.
Um möglichst wenig Suzukacillin-Substanz zu verlieren, wurden Fraktionen aus den vorhergegangenen Trennungen, die vorwiegend unzersetztes Suzukacillin A enthielten, einer 18 h und einer 7 h Hydrolyse unterzogen. Bei diesen Hydrolysen konnten weitere N-terminale Sequenzen isoliert werden.

4.2. Isolierung der Partialsequenzen nach Trifluoracetolyse von Suzukacillin A

Das Peptidantibiotikum wird bevorzugt in einen α-helikalen N-Terminus und einen nicht helikalen C-Terminus gespalten, wobei jeweils verschiedene Sequenzanaloge entstehen. Der N-Terminus tritt sowohl als acetyliertes Tridekapeptid auf, als auch, nach Abspaltung von Ac-Aib-OH, als Dodekapeptid. Von diesem N-terminalen Peptid wird bei längerer Hydrolysedauer die Sequenz Gly-Leu-Aib abgespalten. Die Bruchstücke Aib-Ala-Aib und Aib-Aib aus dem Partialhydrolysat der 18 h Hydrolyse deuten auf weitere Zersetzung des helikalen Teils. Der C-terminale Teil besteht aus zwei sequenzanalogen Heptapeptiden, von denen bereits nach dreistündiger Hydrolysedauer die Sequenz Pro-Val-Aib-Iva(Aib) abgespalten wird.

Nachdem sich mit System I auf Kieselgel-Platten eine gute Trennung der durch Trifluoracetolyse erhaltenen Spaltprodukte erreichen ließ, wurde dieses System auf Kieselgel-Fertigsäulen übertragen. Auf diese Weise konnte das Oligopeptidgemisch fraktioniert werden (Abb. 4.5.). Die weitergehende Trennung wurde durch Anwendung verschiedener Säulenmaterialien und Laufmittel sowie präparativer Dünnschichtchromatographie erreicht, wobei die Aufreinigung jeweils der Zusammensetzung der miteluierten Peptidsequenzen angepaßt werden mußte.

Eine Anwendung der multiplikativen Gegenstromverteilung war wegen der geringen Substanzmengen nicht angezeigt. Aus diesem Grund wurde auch die Trennung an Kieselgel eingeschränkt, da sie zu Substanzverlusten bis zu 20 % führte. In fast allen Fällen mußten die Fraktionen, die für eine Isolation noch sinnvolle Mengen einer Komponenten enthielten, durch wiederholte Gelchromatographie mit Sephadex LH 20 oder Sephadex G 10 gereinigt werden. Schwierigkeiten bereitete oft das Abtrennen von Sequenzen, die sich um 2-4 Aminosäuren an Sequenzlänge unterschieden. Hier konnte eine befriedigende Trennung oft nur durch präparative Dünnschichtchromatographie mit geeigneten Laufmitteln erreicht werden. Anschließend mußten die isolierten Partialsequenzen auf Sephadex LH 20 (System IV) wieder von miteluiertem Kieselgel befreit werden. Auf diese Weise konnten Fraktionen sequenzanaloger Oligopeptide isoliert werden. Die einzelnen Sequenzanaloga konnten bei den geringen Mengen isolierter Peptide nicht aufgetrennt werden.

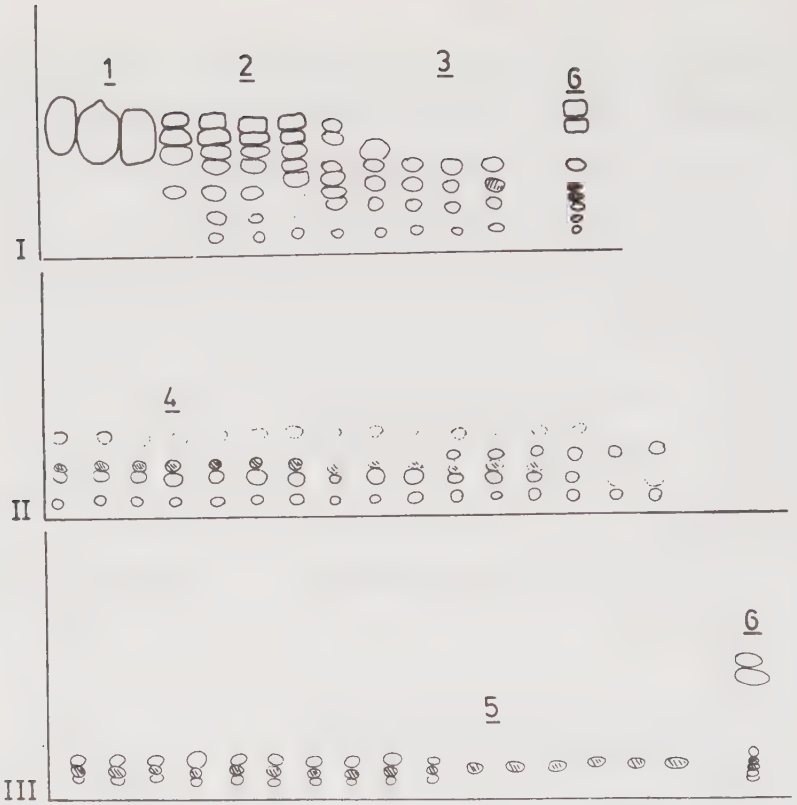


Abb. 4.5. Dünnschichtchromatographisches Bild der nach Trifluoracetolyse (3 h, 37°C) von 500 mg Suzukacillin A und nachfolgender Chromatographie an einer Kieselgel-Fertigsäule (Fließmittelsystem I) bei Raumtemperatur erhaltenen Fraktionen. Gezeigt werden die bis zu einem Fraktionsvolumen von 1800 ml erhaltenen Fraktionen (Anfärbung mit TDM, Fließmittelsystem I).

1 Suzukacillin A, nicht gespaltenes Ausgangsmaterial
2 Suzukacillin A, Ac-Aib-OH, N-acetylierte Sequenzen-(1-13)
3 Ninhydrin positive Peptide, Dodekapeptid-(2-13), Nonadekapeptid-(2-20)
4 Pro-Val-Aib-Iva(Aib)-(14-17)
5 Pro-Val-Aib-Iva(Aib)-Gln-Gln-Pheol-(14-20)
6 Partialhydrolysat von Suzukacillin A, Vergleich

Die Fraktionen überlappen, angegeben sind die Hauptbestandteile.

In den so erhaltenen Fraktionen sequenzanaloger Oligopeptide wurde die Reihenfolge der Aminosäuren durch weitergehende Spaltung mit konz. HCl und anschließender GC-MS - Analyse (81) der trifluoracetylierten und mit Methanol/ Diazomethan veresterten Di-, Tri- und Tetrapeptide bestimmt. Kürzere Peptide wurden ohne Hydrolyse massenspektrometrisch untersucht.
Einige Aussagen über die N-terminale Aminosäure konnten schon durch das Anfärbeverhalten der jeweiligen Sequenz gemacht werden, und die Aminosäurenzusammensetzung ergab sich natürlich aus der Aminosäurenanalyse.

4.3. Sequenzierung isolierter Fragmente aus Suzukacillin A durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Das Einwirken von 12 N HCl bei 37°C (24 h) zerlegt die isolierten Oligopeptide in ein Gemisch von Peptiden unterschiedlicher Kettenlänge. Diese Fragmente wurden nach F. Weygand et al. (82) verestert und mit Trifluoressigsäureanhydrid acyliert. Die relativ leichtflüchtigen N,O-acylierten Peptidester werden gaschromatographisch getrennt und massenspektrometrisch untersucht (102).[x]

[x]Herrn Prof. W. A. König und seinen Mitarbeitern sei für die diesbezüglichen Untersuchungen recht herzlich gedankt.

4.3.1. Massenspektrometrische Untersuchung der C-terminalen Prolylpeptide

Die Aminosäurenanalyse am Biotronik-Aminosäurenanalysator lieferte für das Heptapeptid folgende Werte: 1 Val, 1,47 Aib, 1 Pro, 2,06 Glu, 1 NH_3;
Im Totalhydrolysat (Tfa/OMe Derivate) wurden zusätzlich durch Gaschromatographie Phenylalaninol und Isovalin nachgewiesen.
Eine weitere Probe wurde nach Partialhydrolyse mit GC-MS untersucht (Tfa/OMe Derivate), wobei folgende Teilsequenzen identifiziert wurden:

14	15	16	17	18	19	20
Pro	Val	Aib				
Pro	Val	Aib	Aib			
Pro	Val	Aib	Iva			
	Val	Aib	Iva			
				Glu	Glu	
					Glu	Pheol

Die beiden im Partialhydrolysat identifizierten Tetrapeptide sowie die durch Aminosäurenanalyse nachgewiesene Nichtstöchiometrie bei α-Aminoisobuttersäure zeigen, daß die Aminosäure in Position 17 ausgetauscht ist. Es liegt ein Sequenzaustausch zwischen Aib und Isovalin vor.
Um eine Verwechslung mit der in früheren Arbeiten (6) postulierten Sequenz Val-Aib-Val auszuschließen, wurde eine Probe von Suzukacillin A mit 12 N HCl behandelt und das Partialhydrolysat gaschromatographisch untersucht. Durch Zugabe der Sequenz Val-Aib-Val zum Partialhydrolysat und

nochmaliger Gaschromatographie konnte diese Sequenzfolge im Suzukacillin A ausgeschlossen werden. Die Aminosäure in Position 17 ist somit Isovalin, welches teilweise gegen Aib ausgetauscht ist. Dies ist auch eindeutig NMR-spektroskopisch nachweisbar (Abschn. 5.2.).

Zur Ermittlung der Molmasse diente eine Untersuchung des Heptapeptids mittels Felddesorptions-Massenspektrometrie (83). Das Spektrum lieferte vier Massenzahlen, die folgenden Sequenzen zugeordnet wurden (Abb. 4.6):

Abb. 4.6. Zuordnung der durch FDMS erhaltenen Molmassen des Prolylheptapeptids (14-20)

MG = 774 Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol

MG = 788 Pro-Val-Aib-Iva-Gln-Gln-Pheol

MG = 796 Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol ($+Na^+$)

MG = 810 Pro-Val-Aib-Iva-Gln-Gln-Pheol ($+Na^+$)

Abb. 4.7. Molmassenbestimmung durch FDMS von Pro-Val-Aib-Aib(Iva)-Gln-Gln-Pheol
Bedingungen: FDMS, Ionenquellentemperatur 64°C

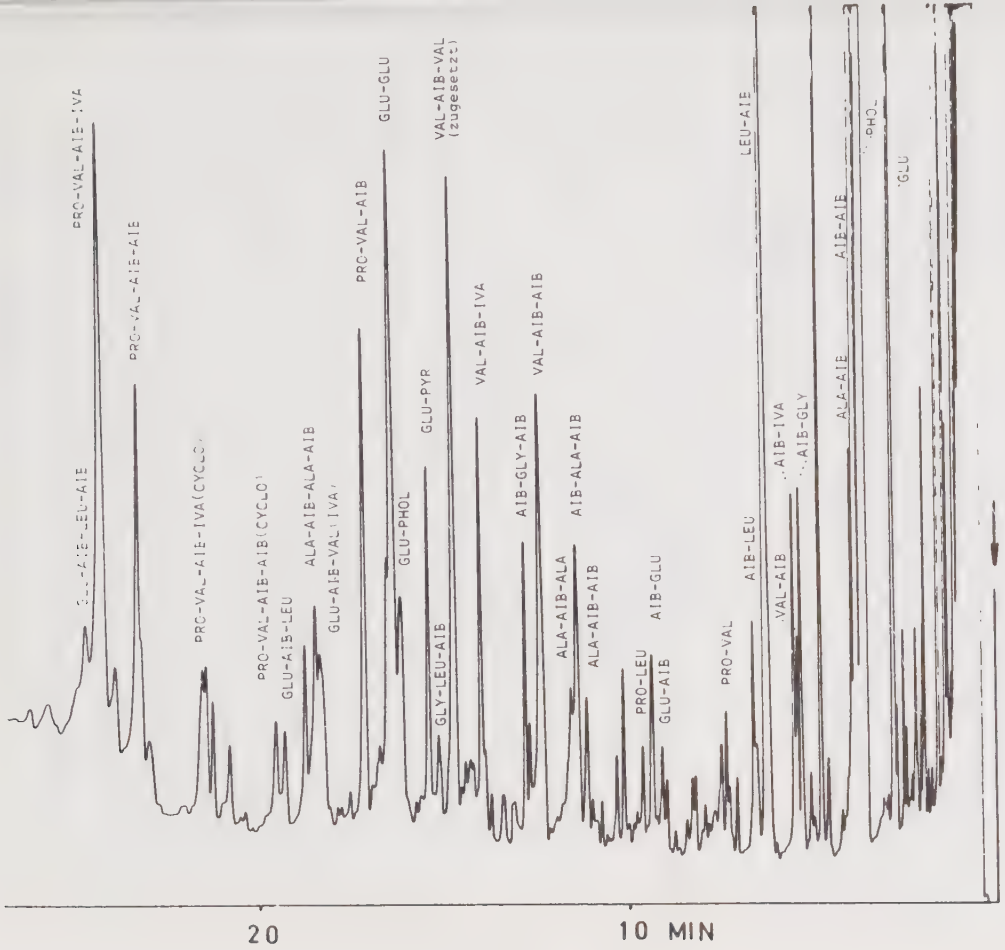


Abb. 4.8. Gaschromatographische Trennung einer Mischung von N-Trifluoracetylpeptidmethylestern, erhalten durch Hydrolyse von Suzukacillin A (12 N HCl, 24 h, 37°C), Veresterung und nachfolgender Trifluoracetylierung.
Bed.: Säulenmaterial Cp-sil-5 (25m/0,3mm) Trägergas H_2, Temperaturprogramm 80°C, 3°C pro min;

Weiterhin konnte durch Vergleich der massenspektrometrischen Fragmentierungsmuster der isolierten Heptapeptide mit synthetischem Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol (103) das natürliche Prolylheptapeptid charakterisiert werden (siehe Tab. 4.1., Abb. 4.9. und 4.10.).

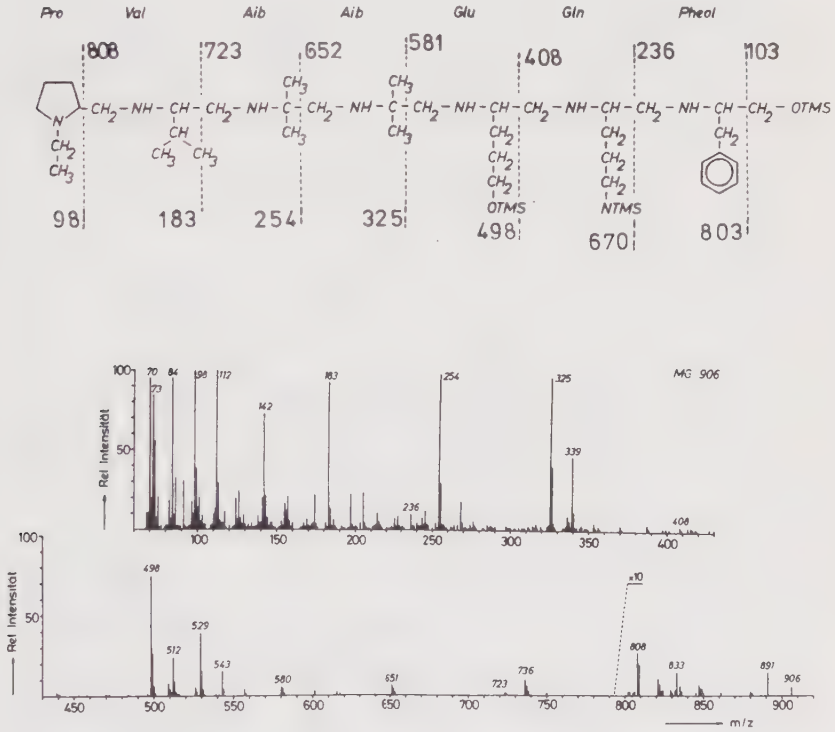


Abb. 4.9. Massenspektrum und Fragmentierungsschema von synthetischem Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol, Bedingungen wie Abb. 4.10.

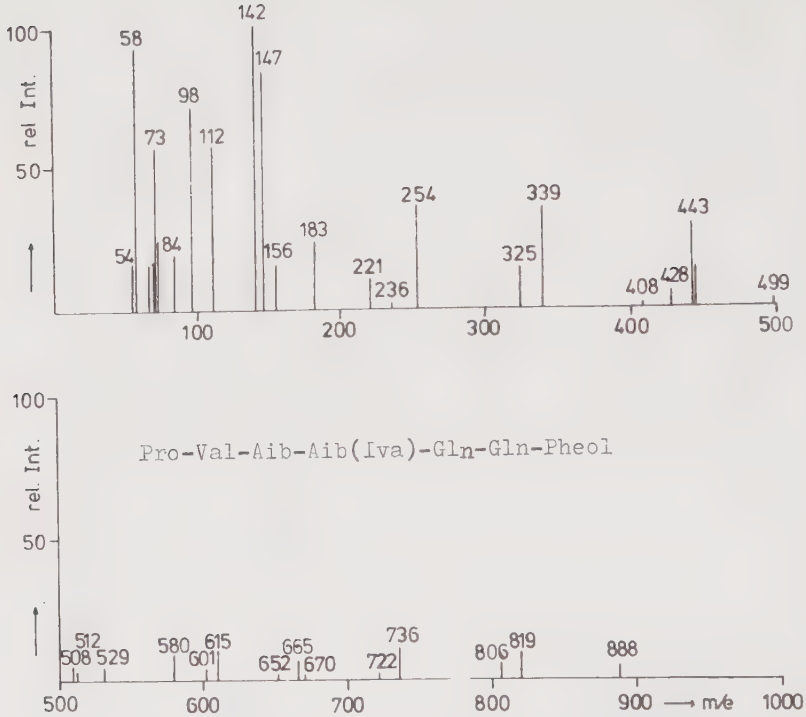


Abb.4.10. Massenspektrum und Fragmentierungsschema von Pro-Val-Aib-(Aib)Iva-Gln-Gln-Pheol isoliert aus dem Partialhydrolysat von Suzukacillin A. Bedingungen: N-Ac, B_2H_6, TMS; Direkteinlaß, EI, 70 eV.

Durch dünnschichtchromatographische Vergleiche mit den Syntheseprodukten Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol (103) und Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol konnte die Sequenz Glx-Glx im C-Terminus als Gln-Gln charakterisiert werden (siehe Abschn. 3.3).

Die Ergebnisse der GC-MS Untersuchungen bezüglich der Überlappung der Partialsequenzen, die quantitative Aminosäurenanalyse, Endgruppenbestimmung durch selektive Sprühreagentien sowie Felddesorptions-Massenspektroskopie und 13-C-NMR Messungen (Abschnitt 5.2.) belegen die in Abb. 4.10. dargestellte Sequenz.

Das zweite, mit Isatin anfärbbare Prolylpeptid wurde als Tetrapeptid Pro-Val-Aib-Iva identifiziert. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abb. 4.11. dargestellt.

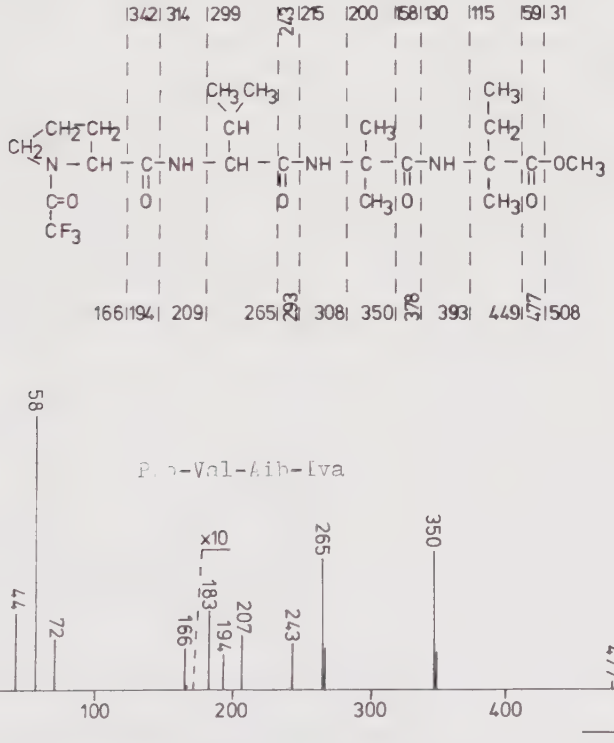


Abb. 4.11. Massenspektrum und Fragmentierungsschema des Trifluoracetyl-prolyltetrapeptid-methylesters (Direkteinlaß, EI, 70 eV).

Tab. 4.1. Vergleich der aus Suzukacillin A isolierten Prolylheptapeptide mit den synthetischen Prolylpeptiden

	R_F-Wert		
	System I	II	III
Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol synthetisch[x]	0,12	0,42	0,27
Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol synthetisch[x]	0,16	0,42	0,53
Pro-Val-Aib-Aib(Iva)-Gln-Gln-Pheol aus Suzukacillin A	0,16	0,42	0,53
Pro-Val-Aib-Iva aus Suzukacillin A	0,22	0,54	0,32

[x]Die geschützten Peptide (Boc, Glu-OBzl) wurden hydriert, mit Tfa in CH_2Cl_2 die Boc-Gruppe abgespalten (3 min), zur Trockene eingeengt und durch Zusatz von etwa 5 proz. $NaHCO_3$-Lösung neutralisiert. Das Produkt wurde in Methanol über Sephadex LH 20 chromatographiert.

4.3.2. Massenspektrometrische Untersuchungen des N-terminalen Dodekapeptids

Mit der "Ionisierung durch schnelle Atome" (Fast Atom Bombardment, FAB) (84-86) verfügt der Massenspektroskopiker über eine Methode zur Spektrenaufnahme von Verbindungen, die wegen ihrer hohen Molmasse oder ihrer Polarität bisher nicht gemessen werden konnten. Durch FAB sind nun viele Naturstoffe, darunter auch underivatisierte Peptide sowie polare Antibiotika der massenspektrometrischen Analyse zugänglich.

Als erste helikale und somit dem N-Terminus zugeordnete ninhydrin-positive Sequenz konnte ein Bruchstück der Aminosäurenzusammensetzung 1,42 Leu, 5,99 Aib, 2,63 Ala, 1 Gly und 1,3 Glu isoliert werden. Spuren von Val (3%) und Pro deuten auf geringe C-terminale Verunreinigungen, die auch zu dem leicht erhöhten Glu-Wert führen. Auch treten in allen N-terminalen Sequenzen Spuren von Isoleucin auf. Bei der gaschromatographischen Untersuchung des Totalhydrolysates konnten neben Leu, Aib, Ala, Gly und Glu ebenfalls Spuren von Pro, Val, Iva und Pheol nachgewiesen werden (Abb.4.12.).

Abb 4.12. Gaschromatographische Auftrennung des Totalhydrolysates (6 N HCl, 110°C, 18 h) des Dodekapeptids (2-13) nach Veresterung mit Isopropanol/HCl und Trifluoracetylierung. Säulenmaterial Cp-Sil-5 (25 m/0,3 mm); Trägergas H_2; Temperaturprogramm 70°C, 3°C pro min.

Von diesem Teilstück (Dodekapeptid, 2-13) wurde ein Massenspektrum aufgenommen. Die Probe wurde N-acetyliert, mit Diboran reduziert und trimethylsilyliert (Abb.4.13.). Das Massenspektrum ist bei 70 eV mit Elektronenstoßionisation (EI) aufgenommen.

Abb. 4.13. Fragmentierungsschema mit Massenzahlen und Intensitäten aus dem Massenspektrum des N-terminalen Dodekapeptids (2-13).

Abb. 4.13. zeigt das Fragmentierungsschema des Dodekapeptids. Die Zahlen neben den punktierten Strichen bedeuten jeweils Massenzahl und relative Intensität. Durch den Austausch verschiedener Aminosäuren kompliziert sich das Spektrum erheblich. Von Gln an wird bei den Sequenzionen jeweils eine um eine Massenzahl reduzierte Massenzahl beobachtet. Dies ist für Gln typisch und auch in anderen Beispielen beobachtet worden[x].

Die in Abb. 4.13. als Position 5 bezeichnete Aminosäure Alanin ist zum Teil gegen Aib ausgetauscht.

Durch den Austausch von Aib gegen Leucin in Position 8 splitten die Sequenzionen der A- und Z-Serie weiter auf.

Der Austausch von Aib und Leu in Position 8 gegen Iva ist nur zu einem geringen Prozentsatz anzunehmen, da in den 13-C-NMR Spektren des N-terminalen, acetylierten Tridekapeptids (1-13)(Abschnitt 5.2.) keinerlei Isovalin-Signale auftreten.

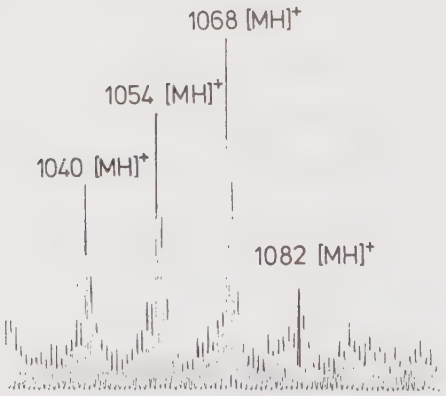
Weiterhin wurde von dem N-terminalen Dodekapeptid (2-13) ein FAB-Spektrum aufgenommen (Abb. 4.14.). Es zeigt die Molmassen 1039, 1053, 1067 und mit geringer Intensität 1081 an. Diese verschiedenen Massenzahlen stimmen mit den aus dem Massenspektrum (Abb. 4.13.) des Dodekapeptids abgeleiteten Sequenzen überein (Tab. 4.2.).

[x]Mitteilung von Herrn Prof. W.A.König, Universität Hamburg;

Tab. 4.2. Reihenfolge der Aminosäuren in den aus dem Partialhydrolysat von Suzukacillin isolierten Dodekapeptiden (2-13).

Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Aib-Aib-Gly-Leu-Aib	MG	1039
Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Gly-Leu-Aib	MG	1053
(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Iva-Aib-Gly-Leu-Aib)	MG	1053
(Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Iva-Aib-Gly-Leu-Aib)	MG	1067
Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Leu-Aib-Gly-Leu-Aib	MG	1067
Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Leu-Aib-Gly-Leu-Aib	MG	1081

Abb 4.14. FAB-Spektrum des N-terminalen Dodekapeptids (2-13).



Alle hier vorgeschlagenen Sequenzen sind anhand der im Partialhydrolysat von Suzukacillin A aufgefundenen Bruchstücke belegt. Da in früheren Partialhydrolysaten (6) die Hexapeptide Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib(Ala) identifiziert wurden, dürfte am N-Terminus dieser Sequenz noch Aib bzw. Ac-Aib stehen. Dies wird durch die in Abschnitt 4.4.und 5.2. beschriebenen Untersuchungen eines acetylierten Tridekapeptids belegt.

4.3.3. Massenspektrometrische Untersuchung des Tripeptids Gly-Leu-Aib

Eine Probe der Aminosäurenzusammensetzung 1 Gly, 0,95 Leu, 1,08 Aib wurde ohne Hydrolyse untersucht. Das Massenspektrum der N-acetylierten, mit B_2H_6 reduzierten und trimethylsilylierten Sequenz ergab eindeutig die Sequenz Gly-Leu-Aib. Dies stimmte auch mit der Beobachtung überein, daß Peptide mit N-terminalem Glycin mit Ninhydrin gelborange anfärben.

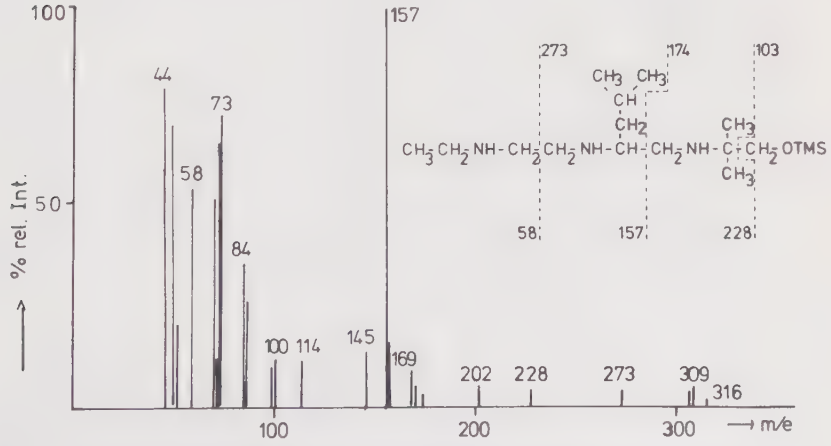


Abb.4.15. Massenspektrum des Tripeptids Gly-Leu-Aib

4.3.4. Massenspektrometrische Untersuchungen von kurzen Partialsequenzen

Bei der Aufreinigung größerer Oligopeptide fielen auch geringe Mengen kurzer, mit Ninhydrin rot anfärbender Peptide an. Zwei der isolierten Fragmente konnten mit Hilfe der Massenspektroskopie und durch vergleichende Gaschromatographie als Aib-Aib und Aib-Ala-Aib charakterisiert werden.

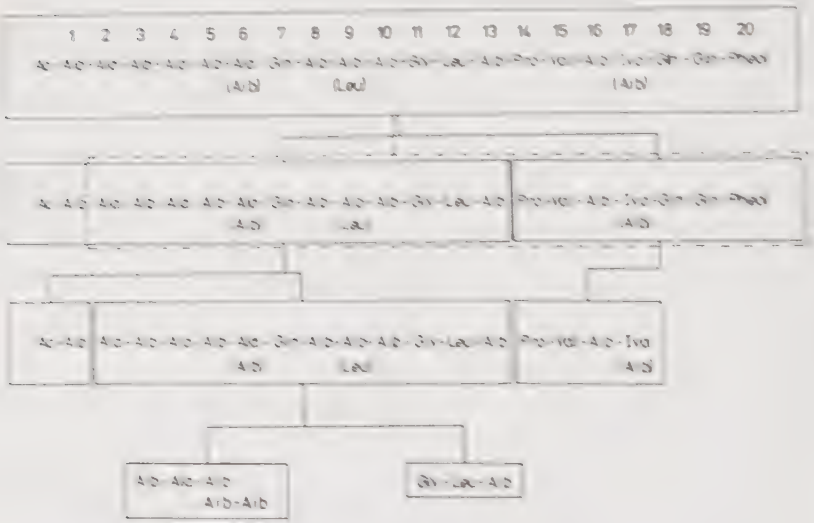


Abb. 4.16. Sequenz des Suzukacillin A und daraus durch selektive Acidolyse erhaltener Fragmente

4.4. Molmassenbestimmung durch FAB und FDMS

Die Sequenzen Suzukacillin A-(1-20) (Abb.4.17., 4.18.) und das Nonadekapeptid-(2-20) sowie das N-Acetyl-tridekapeptid-(1-13) und das Dodekapeptid-(2-13) wurden massenspektrometrisch mit FAB oder FD untersucht. Die Zuordnung der gemessenen Molmassen zu den jeweiligen Sequenzanalogen ist Tabelle 4.3. zu entnehmen. Zu beachten ist, daß bei FDMS-Messungen im Molmassenbereich 1500 die Meßgenauigkeit um ± 1 differieren kann.

Für Suzukacillin A wurden aufgrund von FD-Messungen 8 Sequenzanaloga gefunden. Molekülionenpeaks von Suzukacillin A unterscheiden sich um 22 Masseneinheiten von Molekülionenpeaks von SZ A(+ Na^+) (Abb.4.18.)

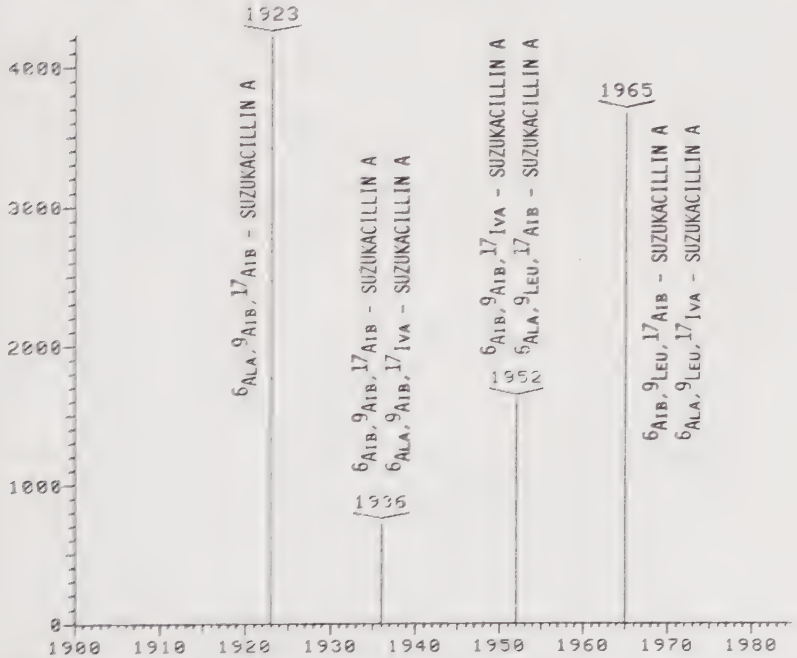


Abb. 4.17. Felddesorptions-Massenspektrum von Suzukacillin A; Lösungsmittel Methanol, Ionenquellentemperatur 60 °C

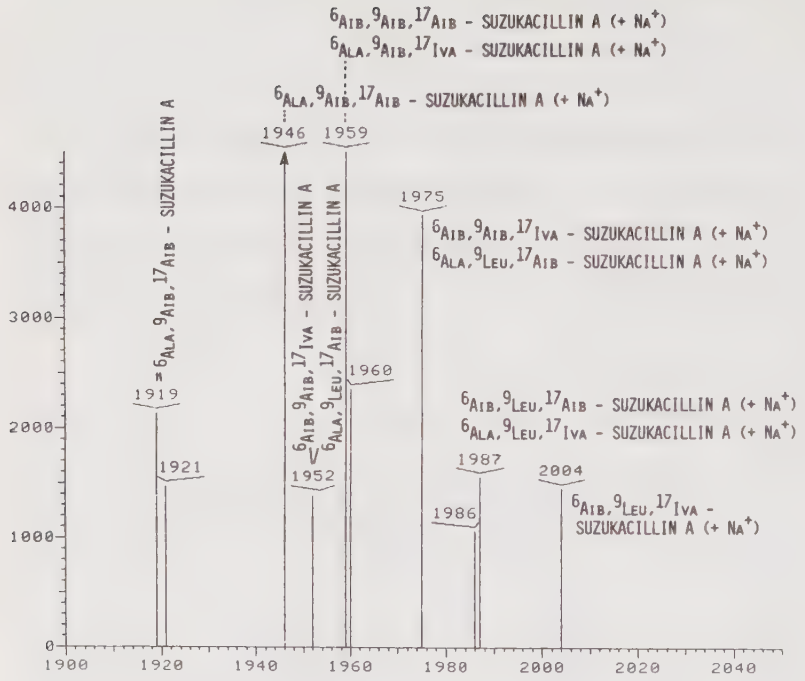


Abb. 4.18. Felddesorptions-Massenspektrum von Suzukacillin A; Lösungsmittel Methanol, Ionenquellentemperatur 60 °C

Tab. 4.3. Molmassenbestimmung durch FAB oder FDMS bei isolierten Suzukacillin A - Sequenzen

Sequenz: Suzukacillin A-(1-20)

Position				FDMS	FAB	berechnet
6	9	17				
Ala	Aib	Aib		1919 1921 1923		1922
			$+Na^+$	1946		1945
Aib	Aib	Aib		1936		1936
Ala	Aib	Iva	$+Na^+$	1959 1960		1959
Aib	Aib	Iva		1952		1950
Ala	Leu	Aib	$+Na^+$	1975		1973
Aib	Leu	Aib		1965		1964
Ala	Leu	Iva	$+Na^+$	1986 1987 1988		1987
Aib	Leu	Iva	$+Na^+$	2004		2001

Sequenz: Nonadekapeptid-(2-20)

Aib Ala	Aib Leu	Iva Aib		1823	1823
Aib Ala	Leu Leu	Aib Iva		1837	1837
Aib	Leu	Iva		1851	1851
Aib	Leu	Iva	OMe	1865	1865

Sequenz: Tridekapeptid-(1-13)

Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Gly-Leu-Aib
(Ala) (Leu)

Position 6	Position 9		FDMS	FAB	berechnet
Aib	Aib				1180
		(-Ac, CH_2-CO-)		1136	1138
Ala	Aib			1166	1166
Aib	Leu				1208
		(-Ac, CH_2-CO-)		1166	1166
Ala	Leu				1194
		(-Ac, CH_2-CO-)		1151	1152

Sequenz: Tridekapeptid-(1-13)

Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Gly-Leu-Aib
(Ala) (Leu)

Aib	Aib		1053	1053
Ala	Aib		1039	1039
Aib	Leu		1081	1081
Ala	Leu		1067	1067

Tab. 4.4 Aminosäure-Analysen von isolierten Spaltpeptiden.

Sequenz	Asp	Ala	Aib	Gln	Gly	Leu	Lys
Pentadekapeptid (1-15)	1	1,22	3,71	0,97	1,05	1	0,98	+
Undekapeptid (3-13)	0,9	1,07	3	0,73	1,07	1	1,15	+
Tridekapeptid (1-13)	-	-	2,45	0,76	+	0,9	0,9	-
Pentapeptid (1-5)	-	-	2	0,93	1,3	1	1,42	-
Heptapeptid (1-7)	1	1	1,47	-	1,06	-	-	+
Tetrapeptid (11-14)	1	1	1,1	-	-	-	-	+
Dipeptid (11-12)	-	-	1,38	-	-	1	0,93	-

5. Konformationsuntersuchungen

5.1. Circulardichroismus

Asymmetrische Zentren in der Umgebung des Chromophors eines Moleküls verursachen eine unterschiedliche Absorption von links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht.
Dieses Phänomen wird als Circulardichroismus (CD) bezeichnet. Die asymmetrische Umgebung des Carbonylchromophors der Peptidbindung sowie die Sekundärstruktur des Moleküls, welche wie z.B. bei der rechts- und linksgängigen Helix eine chirale Konformation darstellt, führen zu zwei CD-aktiven Cotton-Effekten. Der negative Cotton-Effekt einer α-Helix bei 221-223 nm wird durch den $n\pi^*$-Übergang verursacht (104), der stark positive Cotton-Effekt bei 190 nm und der negative bei 206-208 nm sind auf den $\pi\pi^*$-Übergang zurückzuführen. Dieser ist somit in zwei Komponenten aufgespalten (exciton splitting), und charakteristisch für α-helikale Konformationen, wie sie Poly-L-Glutaminsäure und Poly-L-Lysin annehmen können (105). Der Circulardichroismus bietet die Möglichkeit, Sekundärstrukturen von Peptiden und Proteinen zu analysieren (106-109). CD-Messungen des Alamethicins (110-111), Suzukacillins (6) und Trichotoxins A-40 (17) sowie längerer synthetischer Aib-haltiger Peptide sprechen für das Vorliegen helikaler Strukturen bei diesen Peptiden. Die Schwierigkeit der Heranziehung des CD zur Sekundärstrukturbestimmung liegt bei gleichzeitigem Auftreten mehrerer Konformationsbereiche innerhalb eines Peptids. Dies kompliziert die Interpretation des Gesamtspektrums.
Durch selektive Spaltung, Derivatbildung und Iso-

lierung von Spaltprodukten konnten verschiedene Partialsequenzen von Suzukacillin A und Melittin circulardichroitisch untersucht werden. Aufgrund der in Abb.5.1. gezeigten CD-Spektren können folgende qualitative Aussagen gemacht werden:

1) Für helikale Strukturen charakteristische Spektren zeigen Suzukacillin A (1-20) sowie seine N-terminalen Spaltprodukte. Die Partialsequenzen 2-20 (Nonadekapeptid), 1-13 (Dodekapeptid), 2-13 (acetyliertes Tridekapeptid) und Suzukacillin A-(1-20) weisen negative Cotton-Effekte bei 221-224 nm und 205-207 nm auf. Diese CD-Spektren haben alle einen ähnlichen Kurvenverlauf mit unterschiedlichen Intensitäten der für die α-Helix typischen Extrema.
Anders ist der Kurvenverlauf des CD-Spektrums des Gemisches der beiden sequenzanalogen Prolylpeptide (14-20). Sowohl das synthetisch hergestellte Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol als auch die natürlichen Sequenzanaloga (14-20) weisen bei 203-204 nm einen negativen Cotton-Effekt auf, außerdem treten bei 217-218 nm und 231-232 nm zwei weitere schwache Cotton-Effekte auf.
Vergleichbare Spektren zeigt Boc-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_3$-OPOE (POE = Polyoxyethylen), welches bei 202 nm ein ausgeprägtes Minimun und ein schwaches Maximum bei 222,5 nm aufweist. Ihm wird eine ungeordnete Sekundärstruktur (random coil) vergleichbar der des Poly-L-Lysins (112) zugeordnet. Wahrscheinlicher ist jedoch eine Folge von ß-Turns (Typ III), die eine 3_{10}-Helix bilden.
Ähnliche Konformation zeigt auch das N-geschützte Hepta-

peptid Boc-L-Ala-(Aib-Ala)$_3$-OPOE mit einem'exciton splitting' bei 194 nm (+) und 204 nm (-) und schwachem $n\pi^+$-Übergang bei 235 nm, was als Übergang zu α-helikaler Konformation interpretiert wird (113). Wichtige Vergleichspeptide sind die konventionell synthetisierten Sequenzen Boc-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe und Boc-Gly-L-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe. Sowohl das Hexapeptid als auch das Nonapeptid zeigen weder im Bereich 223-227 nm ($n\pi^+$-Übergang) noch bei 198-206 nm ($\pi\pi^+$-Übergang) Hinweise auf eine helikale Konformation (113). Das Nonapeptid besitzt CD-Minima bei 205 nm und 232 nm und ist somit dem CD-Spektrum des aus Suzukacillin A gewonnenen Prolylheptapeptids-(14-20) am ähnlichsten.

Die Abspaltung von Ac-Aib-OH (Nonadekapeptid, 2-20) zeigte keinen Einfluß auf die helikale Struktur des N-Terminus. Somit ist für die Konformation von Suzukacillin A ein nichthelikales, C-terminales Segment-(14-20) einer im wesentlichen ungeordneten, jedoch fixierten Struktur aus sechs Aminosäuren und Pheol anzunehmen. Der N-Terminus-(1-13) von 13 Aminosäuren liegt in α-helikaler Konformation vor.

2) Circulardichroitische Untersuchungen des Melittins sowie von acetyliertem Melittin ergeben einen dem Suzukacillin A-Spektrum ähnlichen Kurvenverlauf. Beide Peptide geben die negativen Cotton-Effekte bei 206-207 nm und 219-220 nm, die charakteristisch für helikale Strukturen sind (Abb. 5.2.).

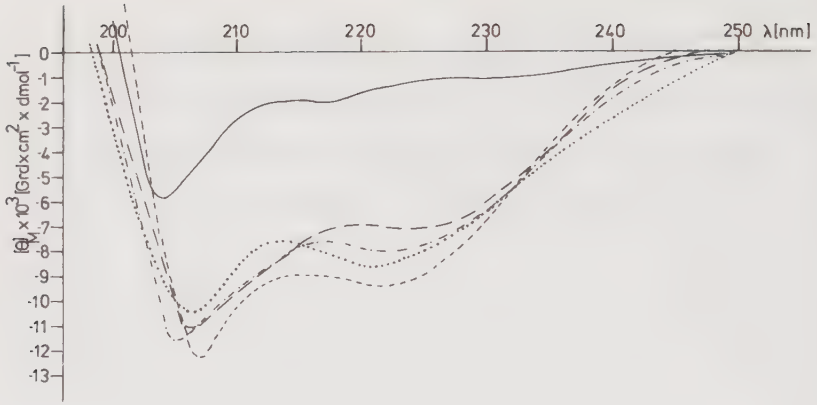


Abb. 5.1. CD-Spektren von aus Suzukacillin A isolierten Partialsequenzen, Lösungsmittel Methanol;
- - - Suzukacillin A-(1-20), - · - Nonadekapeptid-(2-20),
..... Tridekapeptid-(1-13), — — Dodekapeptid-(2-13),
——— Prolylheptapeptid-(14-20).

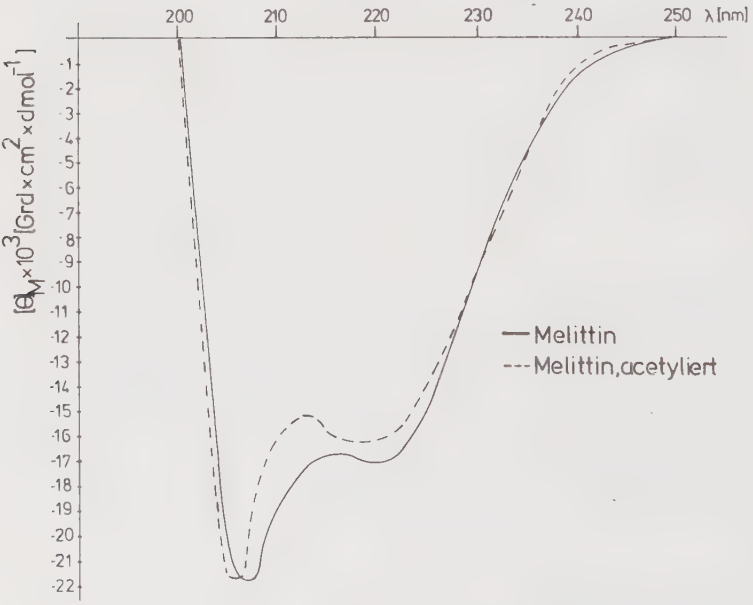


Abb. 5.2. CD-Spektren von Melittin und acetyliertem Melittin in Trifluorethanol

Bei Aib-haltigen Peptiden wurden bisher ß-Turns, die 3_{10}-Helix und die $3,6_{13}$-Helix (α-Helix) röntgenstrukturanalytisch beobachtet. 3_{10}- und α-Helix unterscheiden sich durch ihre Helixganghöhe sowie der Anordnung ihrer Wasserstoffbrücken (Abb. 5.3.).

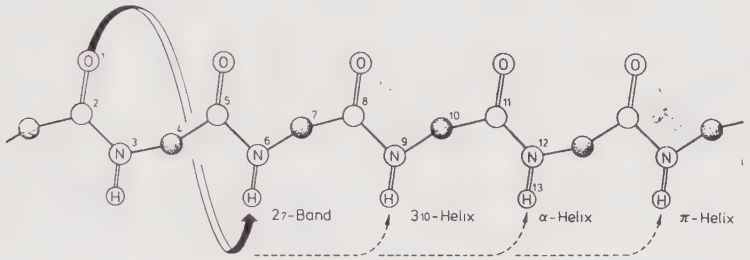


Abb. 5.3. Die Wasserstoffbrücken von einer Helixwindung zur nächsten für die 4 verwandten Helixtypen. Die große Ziffer entspricht der Zahl der Aminosäurenreste pro Windung, die tiefergestellte Ziffer gibt die Anzahl der Atome pro Ring an, der durch die H-Brücken geschlossen wird.Die α-Helix ist somit eine $3,6_{13}$-Helix (147).

Gegen das Vorliegen einer längeren 3_{10}-Helix spricht ihre im Vergleich zur α-Helix energetisch ungünstigere Konformation. Auch wurde in Proteinen das Vorliegen einer 3_{10}-Helix nur selten beobachtet. Von mehreren Arbeitsgruppen (114-119) wurden seit 1977 auf der Basis von Ramachandran-Diagrammen, Röntgen-Strukturanalysen, ^{1}H-NMR- und IR-Untersuchungen von kürzeren Aib-Peptiden und Tos-$(Aib)_5$-OMe (115) eine 3_{10}-Helix auch für Alamethicin postuliert. Von Burgess

und Leach (120) wurde 1977 für Poly-α-Aminoisobuttersäure auf Grund von Röntgen-Strukturdaten eine α-helikale Struktur angenommen. Im selben Jahr wies Malcolm (121) durch Infrarotspektroskopie mit polarisiertem Licht und Elektronendiffraktionsmessungen an Poly-α-Aminoisobuttersäure darauf hin, daß eher eine 3_{10}-Helix vorliege. 1981 durchgeführte ^{1}H-NMR Untersuchungen (270 MHz) von Balaram et al. an synthetischen Alamethicin-Fragmenten (122,123) und Aib-haltigen Modellpeptiden (124,125) wurden mit dem Vorliegen einer 3_{10}-Helix interpretiert. Von der Struktur der bisher untersuchten Aib-Oligopeptide kann jedoch nicht ohne weiteres auf diejenige von Aib-Polypeptiden geschlossen werden.

Durch Röntgenstrukturanalyse eines Undekapeptids konnte 1981 von den Tübinger Arbeitsgruppen Winter und Jung an Boc-(L-Ala-Aib)$_2$-Ala-Glu(OBzl)-(Ala-Aib)$_2$-Ala-OMe **1** (53-55) die α-Helix bewiesen werden. Es ist das bisher längste lineare Peptid, welches mit direkten Methoden gelöst wurde. Das Undekapeptid zeigt 9 von 11 Aminosäureresten in α-helikaler Umgebung. Die α-Helices sind durch je zwei intermolekulare H-Brücken Kopf an Schwanz angelagert und bilden lange Stränge mit antiparalleler Helixachse. Die α-Helix von **1** läßt sich auch in alkoholischen Lösungen durch ^{13}C-NMR und CD nachweisen. Eine 3_{10}-Helix ist somit für den N-terminalen Teil von Suzukacillin und Alamethicin auszuschließen.

Kürzere Aib-Peptide wie Ac-Ala-Aib-Ala-OMe und Boc-Gly-Ala-Aib-OMe (126, 131) nehmen im Kristall und in Lösung ß-Bends

(= ß-Turns) ein. Ein ß-Bend - artiger (durch H-Brücken stabilisierter Knick in einer Peptidkette) Abschluß der α-Helix bei Suzukacillin A, Alamethicin und Trichotoxin A-40 wurde von Jung et al. (127-130) schon früher vorgeschlagen.

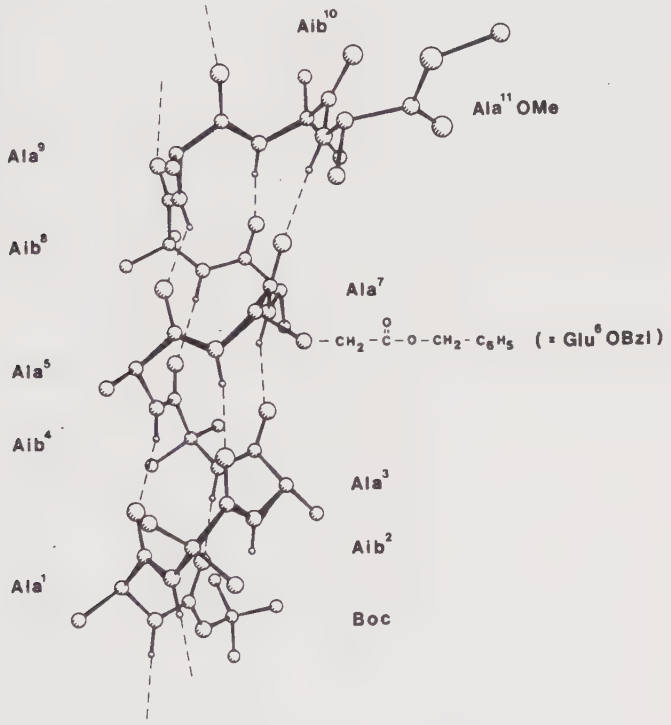


Abb. 5.4. Perspektivische Darstellung des Peptid-Grundgerüsts von 1. Um die Übersicht zu erleichtern, wurden die Atome der Glu^6(OBzl)-Seitenkette weggelassen. Intra- und intermolekulare H-Brücken sind durch gestrichelte Linien angedeutet (54).

5.2. ^{13}C-NMR Untersuchungen an Suzukacillin A und daraus isolierten Partialsequenzen

Bei früher durchgeführten ^{13}C-NMR Untersuchungen von Alamethicin (15,110), Suzukacillin (149) und Trichotoxin (149) konnten die Nachweise für einen N-acetylierten N-Terminus und das Vorliegen der C-terminalen Aminoalkohole Phenylalaninol bzw. Valinol erbracht werden (13,14,110).
Ferner wies ein Methylsignal bei 6,4 ppm in ^{13}C-NMR spektroskopisch untersuchten Proben von Suzukacillin A auf die Anwesenheit einer ungewöhnlichen, nicht proteinogenen Aminosäure hin. ^{13}C-NMR und ^{1}H-NMR Untersuchungen der amphiphilen Polypeptidantibiotika und synthetischer Aib-haltiger Peptide (110,113,136) ließen auch Aussagen über die Konformation dieser Peptide in Lösung zu. Wesentlich für die konformative Analyse ist besonders die magnetische Nichtäquivalenz (MNE) der ß-Methyl-Signale von α-Aminoisobuttersäure. Die Aufspaltung von $\Delta\delta$ = 3,5 ppm (Alamethicin) in zwei Signalgruppen deutet auf das Vorliegen einer helikalen Konformation hin (88). Auf diese Weise konnten die Ergebnisse der CD-Untersuchungen überprüft werden (Abschnitt 5.1.). Folgende Aussagen können anhand der Aufspaltung der C_β-Resonanzen von Aib gemacht werden (88):
Dipeptide zeigen eine geringfügige Aufspaltung von $\Delta\delta$ = 0,5 ppm. N-acetylierte Tripeptide (152) und kurze Oligopeptide zeigen eine stärkere Aufspaltung der Aib-C_β Signale

sofern eine geordnete Struktur und damit verbunden eine Einschränkung der Drehbarkeit der mit Aib-C_α verknüpften Bindungen vorliegt.

Die Aufspaltung der C_β-Resonanzen in helikalen Aib-Peptiden bis zu 4 ppm beruht danach auf der stark unterschiedlichen elektronischen Umgebung der beiden Methylgruppen. Diese ist durch die nahezu parallele Ausrichtung der Peptidbindungen entlang der Helixachse vorgegeben. Die Aufspaltung im Suzukacillin A liegt bei 3,6 ppm (3,4 ppm im N-Acetyltridekapeptid-(1-13)). Bei helikalen Aib-Peptiden ist die Signalgruppe bei hohem Feld den pro-(S)- und die bei tiefem Feld den pro-(R)-Metylgruppen zuzuordnen (152).

Weitere Schlüsse sind aus der chemischen Verschiebung der Ala-C_α-Signale zu ziehen. Hier ist die Tieffeldlage (52 ppm) charakteristisch für Alanin in α-helikaler Umgebung, eine Hochfeldverschiebung (49-51 ppm) zeigen C_α-Signale von solvensexponierten, C-terminalen Alaninresten (113, 151).

Die ^{13}C-NMR-Verschiebungen der Aminosäuren in den nachfolgend diskutierten Peptiden erstrecken sich über einen Bereich von 15-180 ppm (ausgenommen Iva-C_γ (153, 154) bei 6,4 ppm). Die Werte sind auf TMS (δ = 0 ppm) berechnet und instrumentell auf die Lösungsmittelsignale von [D] Chloroform und [D] Methanol bezogen.

Gemessen wurde jeweils in einem Lösungsmittelgemisch aus $[^{12}C,^{2}H]$ Chloroform/ $[^{12}C, ^{2}H]$ Methanol (1:1, v/v).

Die Signale bei tiefstem Feld sind die ^{13}C-Resonanzen der Carbonylgruppen (170-180 ppm), gefolgt von den Signalen

der aromatischen Kohlenstoffe des Phenylalaninols (146-140 ppm). Zwischen 40 und 15 ppm erscheinen die Signale der C_{β}-Atome, bei 32-18 ppm die Resonanzen für andere aliphatische Seitengruppen. Im Feldbereich von 43-64 ppm erstrecken sich die Aminosäure-C_{α}-Signale.

5.2.1. ^{13}C-NMR Signale von Suzukacillin A und Partialsequenzen

Das im Spektrum des C-terminalen Prolylpeptids-(14-20) (Abb. 5.5.) bei höchstem Feld erscheinende Signal des Iva-C_{γ} (7,8 ppm) tritt im Suzukacillin A (Abb. 5.5.) bei 6,4 ppm auf, jedoch nicht im Spektrum des N-terminalen, N-acetylierten Tridekapeptids. Somit ist ein N-terminal eingebautes Isovalin auszuschließen.
Signale, die in den Spektren von Suzukacillin A-(1-20) und des Prolylheptapeptids-(14-20) erscheinen, fehlen erwartungsgemäß im Spektrum des N-Acetyl-tridekapeptids-(1-13). Es sind dies die Resonanzen von Prolin, Valin, Isovalin und Pheol. Anstelle des dreifachen Signals bei 31 ppm (Gln-18 C_{γ}, Gln-7,-19 C_{γ}) im Suzukacillin A (Abb. 5.6.) tritt im N-Acetyl-tridekapeptid nur noch ein hochfeldverschobenes Signal bei 29 ppm auf (Abb. 5.7.). Die Aminosäuren Pro, Val, Iva sowie zwei C-terminale Glutamin und der Aminoalkohol Pheol sind somit nur im Prolylheptapeptid-(14-20) vorhanden. Im Spektrum des N-terminalen Tridekapeptids-(1-13) sind die ^{13}C-Signale der Aminosäuren Ala, Leu, Gly sowie helikales Gln und Aib zuzuordnen, deren Resonanzen im nicht-helikalen, C-terminalen Heptapeptid

fehlen.

Nachfolgend seien die wichtigsten Signale und Signalgruppen diskutiert.

Charakteristisch für Suzukacillin A (Abb. 5.6.) und das Tridekapeptid (Abb. 5.7.) sind die bei 15,6 ppm und 52 ppm erscheinenden Signale für drei unterschiedliche Alaninreste in helikaler Umgebung. Das im Tridekapeptid-(1-13) nicht enthaltene Valin zeigt im ^{13}C-NMR von Suzukacillin A alle Resonanzen doppelt. Diese Signalaufspaltung ist auch bei den Aminosäuren Pro (C_α, C_γ), Leu-12 ($C_{\delta a}$, $C_{\delta b}$), Leu-9 ($C_{\delta b}$) und Gly (C_α) sowie dem Aminoalkohol Pheol (C_β, C-1, CH_2OH) von Suzukacillin A zu beobachten (Tab. 5.1.). Sie wird überwiegend durch das Vorliegen von Sequenzanaloga mit unterschiedlichen Austauschpositionen und damit unterschiedlicher Umgebung einzelner Aminosäuren verursacht und weniger durch unterschiedliche Konformationen, wie sich durch Vergleich der entsprechenden Signale von synthetischem und natürlichem Prolylheptapeptid und Suzukacillin A ergibt.

Im Tridekapeptid-(1-13) ist eine Signalaufspaltung bei Gly (C_α), Leu-9,-12 ($C\delta$) zu erkennen.

In den Spektren von Suzukacillin A und des Tridekapeptids treten zwei Leucin-Signale auf, die Leucin in Position 12 und einem in geringem Maße gegen Aib-9 ausgetauschten Leu-9 zuzuordnen sind. Dies ist daran zu erkennen, daß die Signale für Leu-9 $C_{\delta\ a/b}$ eine wesentlich geringere Intensität aufweisen. Auch das bei tieferem Feld liegende Leu-12 C_γ weist eine höhere Intensität auf als Leu-9 C_γ-Signal.

Die C_γ-Atome von Gln-18, Gln-19,-7 ergeben im Suzukacillin A drei deutlich separierte Signale, von denen im Tridekapeptid-(1-13) nur noch das hochfeldverschobene Signal für Gln-7 bei 29 ppm erscheint. Aufgrund eines J-mod. gated spin-echo (GASPE)-^{13}C-NMR Spektrums (156-158) (Abb. 5.7.) des Tridekapeptids konnte dem helikalen Gln-7 das C_α-Signal bei 55,8 ppm (Suzukacillin A 56,4 ppm) zugeordnet werden. Die entsprechenden Signale für C-terminales Gln-18 und Gln-19 liegen im Suzukacillin bei 53,7 ppm und 54,9 ppm und treten im Tridekapeptid nicht auf. Ein ebenfalls im GASPE ^{13}C-NMR-Spektrum des Tridekapeptids separiertes Signal einer CH_2-Gruppe bei 25,6 ppm erlaubte die Zuordnung zu Gln-7 C_β (in Suzukacillin A 25,6 ppm).

Signale minimaler Intensität bei 10,2 (C_δ), 14,4 ($C_{\gamma a}$) und 24,8 ($C_{\gamma b}$) ppm sind den im Suzukacillin A vorhandenen Spuren von Isoleucin zuzuordnen. Diese konnten auch in der Aminosäurenanalyse und gaschromatographisch festgestellt werden. Isoleucin war allerdings in keiner der durch GC-MS analysierten Partialsequenzen zu finden.

Die Position des Pheol CH_2OH-Doppelsignals (62,9/63,0 ppm) wurde auf Grund eines GASPE-^{13}C-NMR Spektrums von synthethischem Alamethicin bestimmt (103).

Das Signal von Pro C_δ (48,7 ppm) fällt mit den Signalen des Lösungsmittels (CD_3OD) zusammen; es ist jedoch anhand des Flächenintegrals zu differenzieren.

Die Aufspaltung der Aib-C_β-Signale in helikaler Umgebung wurde bereits in Abschnitt 5.2. angesprochen. Sowohl im

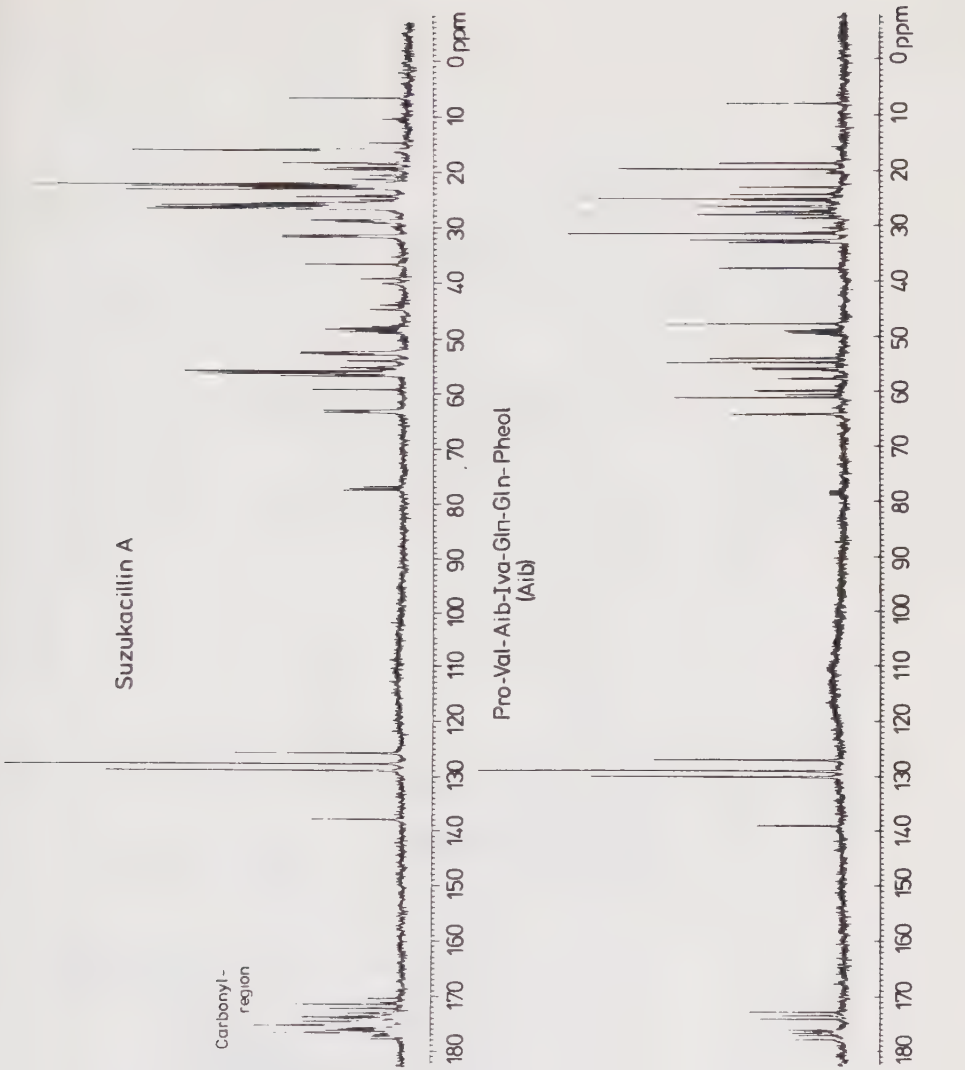


Abb. 5.5. ^{13}C-NMR-Spektren (100,62 MHz) von Suzukacillin A und dem daraus isolierten Heptapeptid-(14-20); $[^{12}C, ^{2}H]$Methanol/$[^{12}C, ^{2}H]$Chloroform (1:1); SZ A: c = 100 mg/400 µl, 20 000 Interferogramme; Prolylheptapeptid: c = 17 mg/400 µl, 48 000 Interferogramme; Temperatur 303 K.

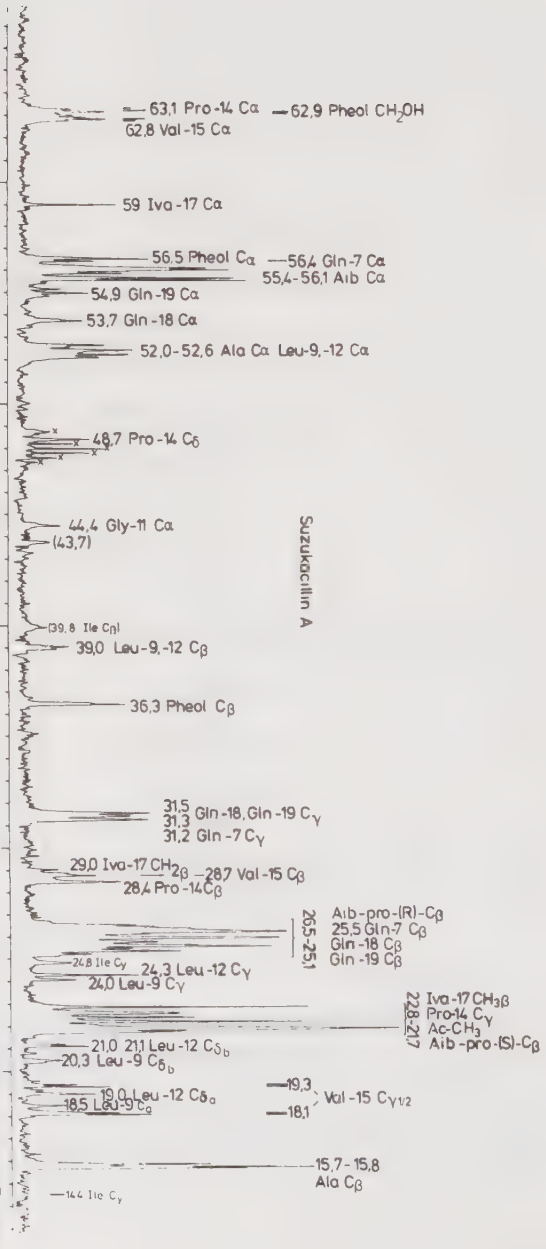


Abb. 5.6. ^{13}C-NMR-Spektrum (100,62 MHz) von Suzukacillin A; [^{12}C, ^{2}H]Methanol/[^{12}C, ^{2}H]Chloroform (1:1); c = 100 mg/400 µl; 20 000 Interferogramme; Temperatur 303 K.

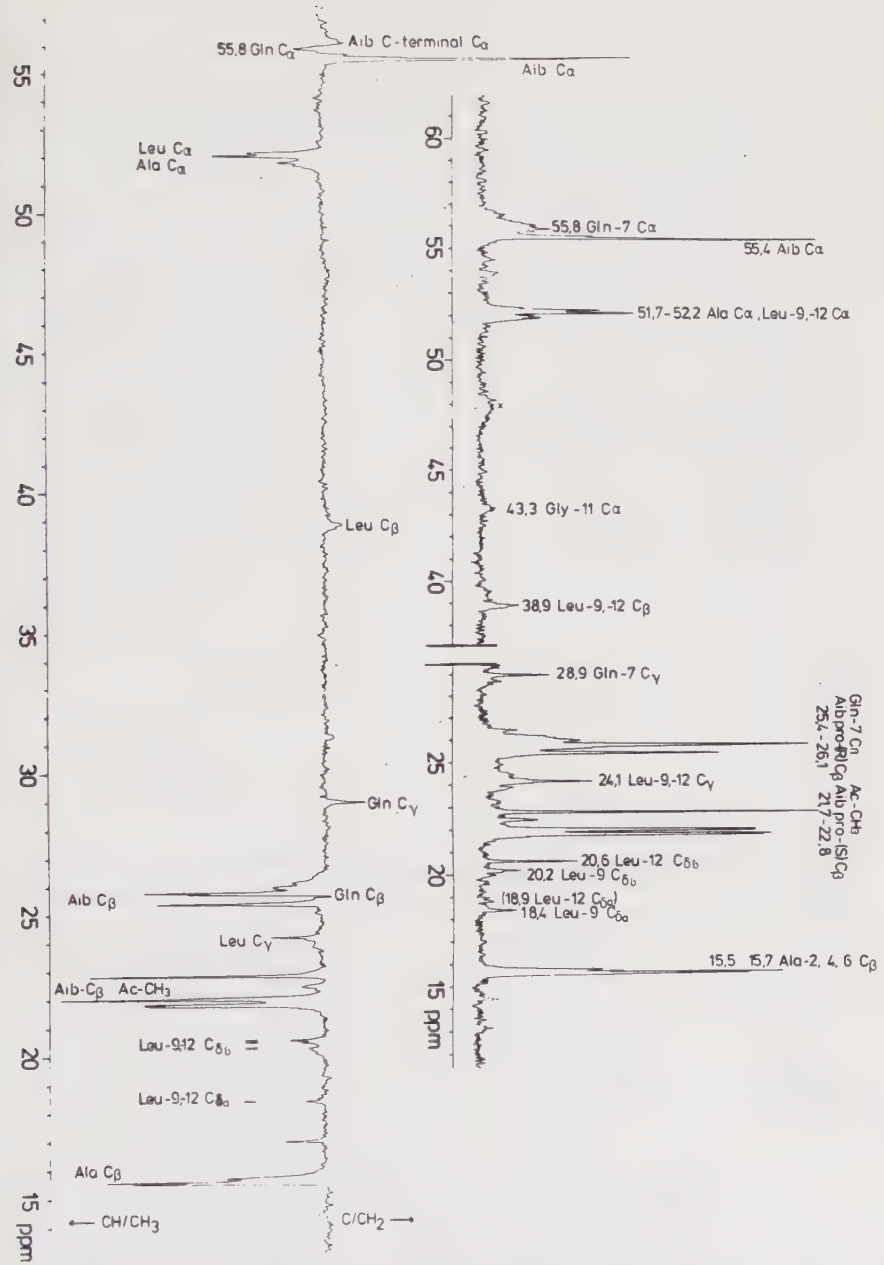


Abb. 5.7. ^{13}C-NMR- und J-mod. GASPE ^{13}C-NMR-Spektrum (100.62 MHz) des aus Suzukacillin A isolierten Tridekapeptids-(1-13); $[^{12}C, {}^{2}H]$Methanol/$[^{12}C, {}^{2}H]$Chloroform (1:1); c = 25 mg/400 µl; 31 804 Interferogramme;

Tab. 5.1. ^{13}C-NMR Signale von Suzukacillin A (1) und von dem N-terminalen Tridekapeptid-(1-13) (2)[x]

δ (ppm) 1	δ (ppm) 2	
6,4	-	Iva C_γ
15,6/15,7/15,8	15,4/15,5/15,7	Ala-2,-4,-6, C_β
18,0/18,1	-	Val $C_{\gamma a}$
18,5	18,4	Leu-9 C δa
19,0/18,9	(18,9)	Leu-12 C δa
19,3/19,4	-	Val C_γb
20,3/20,4	20,2	Leu-9 C δ b
21,0/21,1	20,6	Leu-12 Cδ b
21,7-22,8	21,7-22,8	Aib $C_{\beta a}$, Ac-CH_3, Iva-CH_3 C_β
22,5/22,6	-	Pro C_γ
24,0	(23,9)	Leu-9 C_γ
24,3	24,1	Leu-12 C_γ
25,1-26,5	25,4-26,1	Aib $C_{\beta b}$, Gln-7,-19 C_β, Gln-18 C_β
	25,6	Gln-7 C_β
28,4	-	Pro C_β
28,7/28,9	-	Val C_β
29,0	-	Iva-CH_2 C_β
	28,9	Gln-7 C_γ
31,2/31,3/31,5		Gln-7,-19 C_γ, Gln-18 C_γ
36,3/36,4	-	Pheol C_β
(38,9)	(38,)	Leu-9 C_β
39	38,9	Leu-12 C_β
(43,7)/44,4	43,3	Gly C_α
48,7	-	Pro C δ
52,0/52,3/52,4	51,7/51,8/51,9	Ala-2,-4,-6 C_α, Leu-9,-12 C_α
52,5/52,6	52,1/52,2	

δ(ppm) 1	δ(ppm) 2	
53,7	-	Gln-18 C_α
54,9	-	Gln-19 C_α
55,5-56,1	55,4-55,5 (55,9)	Aib C_α
56,4	55,8	Gln-7 C_α
56,5	-	Pheol C_α
59,0	-	Iva C_α
62,7/62,8	-	Val C_α
62,9/62,8	-	Pheol CH_2OH
63,1/63,2	-	Pro C_α
125,9	-	Pheol C-4
127,6	-	" C-3,5
128,8	-	" C-2,6
137,8/137,9	-	" C-1

$X_{\text{Lösungsmittel}}$ $[^2H, ^{12}C]$Methanol/$[^2H, ^{12}C]$Chloroform (1:1);
δ(ppm) gegen $CDCl_3$ (δ = 77,0 ppm)

Suzukacillin A als auch im Tridekapeptid sind jeweils zwei, im Vergleich zum Leu-12 C_γ Signal nach tieferem bzw. höherem Feld verschobene Signalgruppen zu erkennen.

	Aib-pro-(R)-C_β (ppm)	Aib-pro-(S)-C_β (ppm)
Suzukacillin A-(1-20) (Leu-12 C_γ 24,3 ppm)	25,1-26,5	21,7-22,8 (8-9 Aib-C_β)
Tridekapeptid-(1-13) (Leu-12 C_γ 24,1 ppm)	25,4-26,1	21,7-22,8 (6-7 Aib-C_β)

Eine Ermittlung der Anzahl von Aib-pro-(R)-C_β über das Flächenintegral war nicht möglich, da in diesem Bereich auch die Gln-C_β-Signale liegen. Zudem wäre dies aufgrund der Intensitätsunterschiede von pro-(R)- und pro-(S)-Methylgruppen (unterschiedliche T_1-Werte) (152) viel zu ungenau.

Für Aib-C_α wurden 8 Signale bei 55,4-56,1 ppm erhalten; das Tridekapeptid zeigt keine Aufspaltung dieser Aib-C_α Signale bis auf ein verbreitertes Signal bei 55,9 ppm, welches vermutlich dem C-terminalen Aib-13-C_α zuzuordnen ist.

5.2.2. ^{13}C-NMR Signale von Pro-Val-Aib-Aib(Iva)-Gln-Gln-Pheol und synthetischem Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol

Das ^{13}C-NMR Spektrum des aus Suzukacillin A isolierten Prolylheptapeptid-(14-20) zeigt Signale der Aminosäuren Pro, Val, Iva, Aib, Gln sowie Pheol.

Charakteristisch sind wiederum die Signalaufspaltungen bei Val-15 (C_α, $C_{\gamma b}$), Aib-16 (C_α, $C_{\beta a/b}$), Aib-17 (C_α), Gln-18 (C_α, C_γ), Gln-19 (C_γ) und Pheol (C_α, C_β, CH_2OH, C-1, C-2/6) (Tab.5.2.).

Das Einzelsignal Val-15 $C_{\gamma b}$ zeigt hierbei dasselbe Flächenintegral wie die beiden aufgespaltenen Val-15 $C_{\gamma a}$ Signale zusammen. Die Flächenintegrale von Iva-17 C_γ, Iva-17 $C_\beta(CH_3)$, Aib-17 $C_{\beta b}$ und Aib-17 $C_{\beta a}$ entsprechen ebenfalls je einem halben Flächenintegral von der Doppelresonanz Aib-16 $C_{\beta a}$ oder Aib-16 $C_{\beta b}$ (Abb.5.8.). Dies belegt ein 1:1 Verhältnis der beiden Fragmente Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol und Pro-Val-Aib-Iva-Gln-Gln-Pheol. Diese Tatsache wird auch durch die Intensitätenverteilung der M^+-Peaks im FDMS-Spektrum belegt (Abschnitt 4.4.).

Die Aufspaltung der einzelnen Signale sind beim Prolylheptapeptid somit auf eine unterschiedliche Umgebung der einzelnen Aminosäuren in den beiden Sequenzisomeren zurückzuführen.

Unterschiedliche Konformationen sind auf Grund der beobachteten Intensitätsverhältnisse (exakt 1:1) der aufgespaltenen NMR-Signale auszuschließen. Konformationsbedingte Signalaufspaltungen können andrerseits sowohl bei ^{13}C-NMR- als auch ^1H-NMR-Untersuchungen auftreten, wie das Beispiel des Boc-L-α-Phenylalanins zeigt (155). Die dabei auftretende Aufspaltung des tert.-Butylsignals wurde auf eine intramolekulare Wechselwirkung des Phenylringes mit der Urethan-Carbonylgruppe zurückgeführt (Z/E-Isomerie). Auch bei dem synthetischen Prolylheptapeptid wurden für Phe-C_α und Val-C_β Doppelsignale beobachtet (vergl. Seite 80).

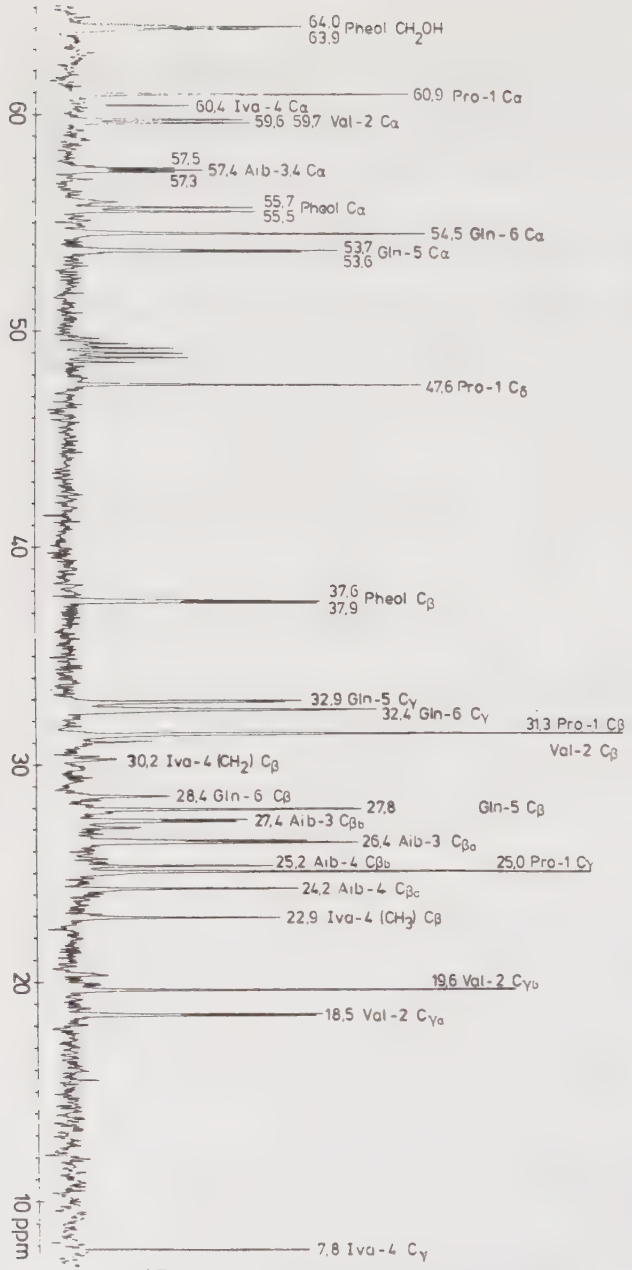


Abb. 5.8. ^{13}C-NMR Spektrum des aus Suzukacillin A isolierten Prolylheptapeptids-(14-20); Bed. siehe Abb.5.5.

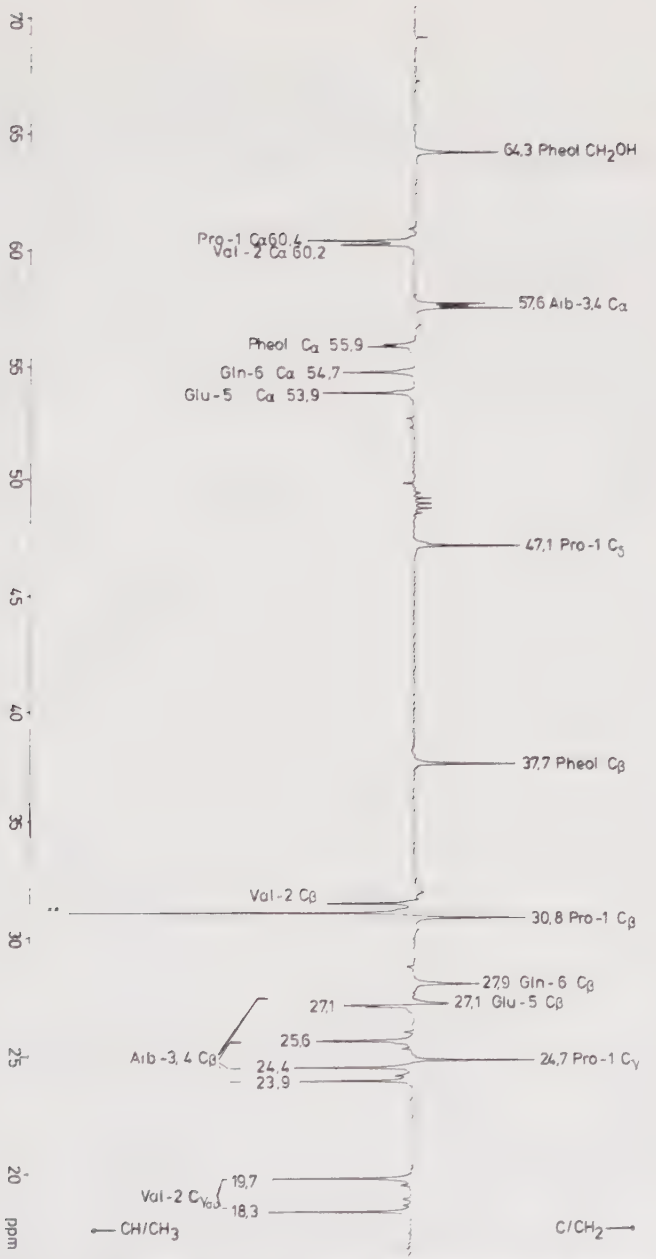


Abb. 5.9. ^{13}C-NMR-Spektrum von synthetischem Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol (Rohprodukt); $^{12}CD_3OD/^{12}CDCl_3$ (1:1), c= 70 mg/400 µl, 11587 scans;
xx CH_3 (Aceton)

Tab.5.2. ^{13}C-NMR Signale von aus Suzukacillin isoliertem Prolylheptapeptid-(14-20) 1 und synthetischem Prolylheptapeptid 2. Lösungsmittel [^{2}H,^{12}C] Methanol/[^{2}H,^{12}C] Chloroform (1:1).

1 Pro-Val-Aib-Aib(Iva)-Gln-Gln-Pheol;

δ(ppm) gegen CD_3OD (δ = 49 ppm) und $CDCl_3$ (δ = 78,25 ppm).

2 Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol;

δ(ppm) gegen $CDCl_3$ (δ = 77,0 ppm).

δ(ppm) 1	δ(ppm) 2	
7,8	-	Iva C_γ
18,5/18,4	18,3	Val $C_{\gamma a}$
19,6	19,7	Val $C_{\gamma b}$
22,9	-	Iva-CH_3 C_β
24,2	23,8	Aib-4 $C_{\beta a}$
25,0	24,7	Pro C_γ
25,2	24,4	Aib-4 $C_{\beta b}$
26,4/26,3	25,6 (2x)	Aib-3 $C_{\beta a}$
27,3/27,4	25,6	Aib-3 $C_{\beta b}$
27,8		Gln C_β
	27,0 (2x)	Aib C_β
	27,1	Glu C_β
28,4	27,9	Gln C_β
30,2	-	Iva-CH_2 C_β
31,3(2x)	30,8/31,6	Pro C_β, Val C_β
32,4/32,5	(31,9)	Gln C_γ
32,8/32,9	(32,6)	Gln C_γ
37,4/37,5	37,7	Pheol C_β
47,6	47,1	Pro C_δ

δ(ppm) 1	δ(ppm) 2	
53,6/53,7	53,9	Gln C_α
54,5	54,8	Gln C_α
55,5/55,7	55,8/55,9	Pheol C_α
57,3/57,4/57,5	57,6 (4x)	Aib-3, Aib-4 C_α
59,6/59,7	60,26	Val C_α
60,4	-	Iva C_α
60,9	60,4	Pro C_α
63,9/64,0	64,3	Pheol CH_2OH
126,9	127,3	Pheol C-4
128,9	129,3	" C-3,5
129,9 (2x)	130,5	" C-2,6
139,9 (2x)	139,8	" C-1

Der von H. Schmitt (103) und U. Vetter synthetisierte C-Terminus des Alamethicins, das Prolylheptapeptid Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol (Abb. 5.9.) zeigt gute Übereinstimmung der vergleichbaren Resonanzen (Tab. 5.2.). Im synthetischen Prolylheptapeptid tritt das Aib-C_α-Signal vierfach auf, Pheol-C_α und Val-C_β erscheinen als Doppelsignal. Das Vorliegen diastereomerer synthetischer Prolylheptapeptide kann ausgeschlossen werden, da keine D-Aminosäuren im Totalhydrolysat gefunden wurden.

Allerdings waren chromatographische und andere Reinheitskontrollen des Syntheseproduktes zum Zeitpunkt der ^{13}C-NMR Aufnahme noch nicht abgeschlossen (vgl. Abschnitt 5.1. und 4.3.1.).

Die geringen Unterschiede in den chemischen Verschiebungen von Pro-C_α und Val-C_α sind vermutlich auf die unterschiedliche Probenvorbereitung zurückzuführen, da das Syntheseprodukt vorher einer Schutzgruppenabspaltung mit TFA unterzogen wurde (150). Die im GASPE ^{13}C-NMR Spektrum von synthetischem Prolylheptapeptid mit sehr schwacher Intensität auftretenden Resonanzen von Glu-18 C_γ und Gln-19 C_γ sind im ^{13}C-NMR Spektrum des geschützten (Boc, OBzl, OMe) synthetischen Prolylheptapeptids mit normalen Intensitäten zu beobachten.

5.3.2. Der Carbonylbereich von Suzukacillin A weist ungefähr 27 Signale auf, unter Berücksichtigung der ausgetauschten Aminosäuren werden 26 Signale erwartet (Tab. 5.3.).

Tab. 5.3. ^{13}C-NMR Carbonyl-Signale von Suzukacillin A 1, Tridekapeptid-(1-13) 2, Prolylheptapeptid-(14-20) 3 und synthetischem Prolylheptapeptid 4.
Lösungsmittel: [^{2}H, ^{12}C]Methanol/[^{2}H, ^{12}C]Chloroform (1:1); 1, 2, 4 δ (ppm) gegen $CDCl_3$ (δ = 77 ppm), 3 δ (ppm) gegen CD_3OD (δ = 49 ppm).

	δ 1 (ppm)	2 (ppm)	δ 3 (ppm)	4 (ppm)	
	170,3			169,7	
	(170,9)				
Gly	171,3	171,3			
Ac-CO	171,4	171,4			Pro
Val	172,2	-			
Iva	172,9	-	172,9		
	173,6	173,6	173,5	173,2	Gln $CONH_2$
Gln $CONH_2$	173,7	173,7			
Gln	173,9	-			
Pro Leu (2x)	174,0	-			
	174,4	174,3	174,2	174,3	Gln
	174,5	174,5			
	174,6	-			
	175,2	175,2			
Ala (3x)	175,3	175,3			
	175,4	-			
	175,7	-			
	175,7	-			
	175,9	175,9			
	176,0	176,0			
Aib (10x)	176,0	176,1			
	176,1	176,2	176,1		Iva
	176,3	176,3			
	176,5	176,3	176,4	176,4	Val
	176,5	176,4			
	176,6	176,5	176,8	176,5	Glu-α-CO Aib
			176,8	176,6	Glu-γ-COOH
	177,3		177,1	176,7	Aib
	177,8		177,9	178,1	

Das Tridekapeptid-(1-13) zeigt 16 Carbonylresonanzen, das Prolylheptapeptid zeigt 9 Signale in diesem Bereich. Dies entspricht der Zahl der erwarteten Carbonylresonanzen. Eine vergleichende Zusammenstellung und vorläufige Zuordnung ist Tabelle 5.3. zu entnehmen.

6. Membranmodifizierende Eigenschaften

6.1. Hämolytische Eigenschaften

Die sequenzähnlichen Polypeptidantibiotika Alamethicin, Suzukacillin und Trichotoxin A-40 lysieren schon in millimolaren Mengen irreversibel die Membranen von Erythrocyten und Lymphocyten (15-18,38,41). Ein bekanntes lyseaktives, natürliches Polypeptid mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften und Molmasse, jedoch mit einer Sequenz aus Proteinaminosäuren, ist das im Bienengift enthaltene Melittin (134,135). Steigt die Peptidkonzentration bei Lyseexperimenten über 10^{-6} mol/l so wird eine Matrixzerstörung beobachtet.
Im folgenden sind die von G. Irmscher (17) an Suzukacillin A durchgeführten Lyseexperimente mit Humanerythrocyten zusammengefaßt. Die Fehlerquellen durch die bei den damaligen Untersuchungen (17, 18) noch unsicheren Molmassen belaufen sich bei Suzukacillin je nach Sequenzanalogem nur auf 1-3 Prozent.

Tab. 6.1. Übersicht über die Polypeptidantibiotikakonzentrationen die bei verschiedenen Zelltypen eine 50-prozentige Lyse hervorrufen.

Zelltyp	Konzentration bei 50 % Lyse (mol/l)x10^{-6}				
	SZ A	SZ B	Alamethicin	TTA-40	Melittin
Humanerythrocyten	7,5	10,1	10,9	10,5	0,27
Mastzellen	25	40	55	40	-
Mäuselymphozyten	40	70	80	70	-

Eine Reduktion der Lyseaktivität um das 3,5-fache bei Melittin und Suzukacillin A findet man bei Zusatz von Rinderserumalbumin. Dies weist auf eine Wechselwirkung der Hämolysine mit Proteinen hin, die nach unseren Erkenntnissen nur hydrophober Natur sein kann.

Zwischen Suzukacillin A und Alamethicin treten kaum Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Hämolyse auf; verglichen wurde bei Peptidkonzentrationen, die nach 30 min 50 % Hämolyse hervorrufen. Ein abweichendes Verhalten zeigt Melittin, hier setzt die lytische Wirkung sofort nach Zugabe ein.

Suzukacillin A zeigte von allen untersuchten Peptiden die geringste Temperaturabhängigkeit: bei einer Konzentration von 2×10^{-5} mol/l wird noch bis 14 °C Vollhämolyse erreicht, (Vollhämolyse durch Alamethicin bei 14 °C bei 8×10^{-5}mol/l) und bei der Konzentration $8{,}1 \times 10^{-5}$mol/l werden selbst unter 0 °C Erythrocyten vollständig zerstört (Alamethicin zeigt bei 4 °C in einer Konzentration von 8×10^{-5}mol/l keine Hämolyseaktivität mehr).

Die Hämolyse bei verschiedenem pH ergab eine Steigerung der Lyseaktivität von niederen zu höheren pH-Werten.

Die Untersuchung der lytischen Wirkung auf Mastzellen zeigte, daß die Konzentrationen, bei denen 50 % der Zellen lysieren, von Suzukacillin A fast doppelt so hoch liegen (Alamethicin viermal) wie für Erythrocyten (Tab. 6.1.). Die Reihenfolge der Lyseaktivität bleibt erhalten. Eine Histaminfreisetzung von 50 % aus Rattenmastzellen kann bei $2{,}2 \times 10^{-5}$mol/l Suzukacillin A (Alamethicin 5×10^{-5} mol/l) erreicht werden.

Bei den Tests zur Lyse von Lymphocyten ist Suzukacillin A ebenfalls das bei weitem wirksamste Peptid. Auch hier liegen die zur Lyse benötigten Konzentrationen erheblich höher als für die Lyse von Mastzellen (Tab. 6.1.).

Die Lyse von Mäuse-Lymphocyten beginnt erst bei Konzentrationen von 50 mg Peptid pro l, eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation setzt jedoch schon bei um 2 Zehnerpotenzen niedrigeren Mengen ein (Suzukacillin hemmt ab 1,5 mg/l, Alamethicin ab 0,5 mg/l).

In der Reihe der Peptidantibiotika ist Suzukacillin A am aktivsten, gefolgt von Suzukacillin B, Alamethicin F-50 und Trichotoxin A-40. Es ist anzunehmen, daß bei dieser Rangfolge neben den Faktoren Aggregation und Sekundärstruktur auch die Lipophilie und Ladung des Peptids eine Rolle spielt, da die Methylester von Trichotoxin A-40 und Alamethicin wirksamer sind als die nativen Peptidantibiotika.

In Übereinstimmung dazu stehen Untersuchungen des synthetischen Nonadekapeptids (136), dessen ^{18}Glu-γ-Benzylester ebenfalls aktiver ist als das Peptid mit freier ^{18}Glu-γ-Carboxy-Gruppe. Ebenfalls untersuchte synthetische Peptide sowie Trichotoxin A-40 - Spaltprodukte mit Kettenlängen von 6-16 Aminosäuren zeigten keine lytischen Aktivitäten (136, 88). Demnach scheint eine Mindestlänge von 18 Aminosäuren erforderlich zu sein, um Lyse hervorzurufen.

Wahrscheinlich wird die Lyse und Matrixzerstörung durch Mobilisierung der Lipidschicht bei Peptidantibiotikakonzentrationen größer 10^{-6} mol/l ausgelöst (148).

6.2. Spannungsabhängige Ionenleitung

Wie das ausführlich untersuchte Antibiotikum Alamethicin (48, 137-141) zeigt auch Suzukacillin A bei nanomolaren Konzentrationen in planaren Lipiddoppelschichtmembranen eine spannungsabhängige Porenbildung. Die ionenleitende Aktivität einer einzigen Pore kann in Form von sprunghaften Änderungen des Membranstromes bei konstanter Membranspannung registriert werden. Die Suzukacillin A Pore zeigt hierbei ein ganz bestimmtes Muster in den Sprungfolgen zwischen verschiedenen Leitwerten (5).

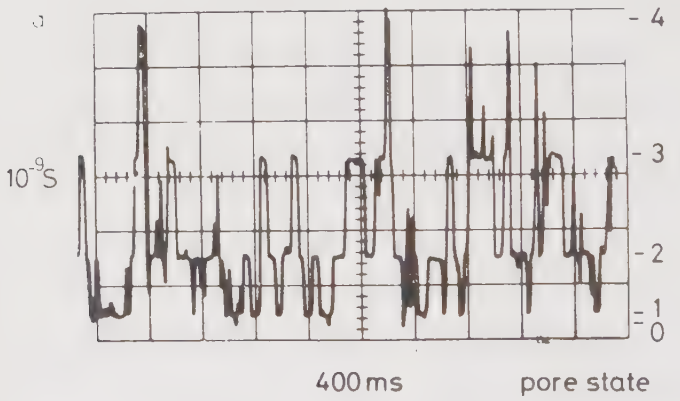


Abb. 6.1. Current fluctuations of a suzukacillin-doped black lipid membrane as a function of time in the presence of a single conducting channel. Membrane solution: 1,25 % di-(18:1)-phosphatidylethanolamine in n-decane; salt solution: 1 M KCl; antibiotic concentration: 2 x 10^{-7} g/ml Suzukacillin in one compartment only; temperature: 19 °C; applied voltage: 100 mV;

Es treten mehrere Leitwerte auf, die keine ganzzahligen Vielfachen voneinander darstellen. Dieses Phänomen wird durch die Annahme einer Pore variablen Durchmessers, die verschiedene Leitwertzustände ausbilden kann, verursacht. Zur Beziehung zwischen der porenbildenden Funktion und der chemischen Struktur des Alamethicins wurde von Boheim, Hanke und Jung (61) der Flip-Flop-Gating Mechanismus vorgeschlagen (Abschnitt 1.2.).

Keinerlei membranaktive Eigenschaften zeigte das nach Trifluoracetolyse aus Suzukacillin A isolierte Prolylheptapeptid-(14-20). Das Fragment Suzukacillin-(2-20) zeigt jedoch spannungsabhängige Porenbildung[X].

Ein anderer Mechanismus, welcher auf der seitlichen Verknüpfung der Alamethicin-Monomeren über Glutamin beruht, wurde von Fox und Richards vorgelegt (142). Dieses Modell kann weder verschiedene Eigenschaften der Alamethicin-Pore noch analoger Strukturen vollsynthetischer α-helikaler (144) Porenbildner erklären.

Von uns durchgeführte Struktur- (Abschnitt 5.1.) und Aktivitätsuntersuchungen (Abschnitt 6.1.) am Melittin[XX] legten es nahe, dieses Polypeptid auch auf porenbildende Aktivitäten

[XX]Herrn Dr. P. Harter, Universität Tübingen, danke ich für die Überlassung der Melittin-Proben.

[X]Danken möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. G. Boheim, Herrn Dr. W. Hanke und Herrn Dr. C. Methfessel, Universität Bochum, für die Messungen und Unterlagen zu den membranmodifizierenden Eigenschaften.

zu untersuchen. Obwohl eine völlig andere Aminosäurenzusammensetzung wie bei Suzukacillin A und Alamethicin vorliegt, konnte mit Melittin-(1-26) und acetyliertem Melittin eine spannungsabhängige Stromleitung mit aufgelösten Leitwertniveaus induziert werden (60).

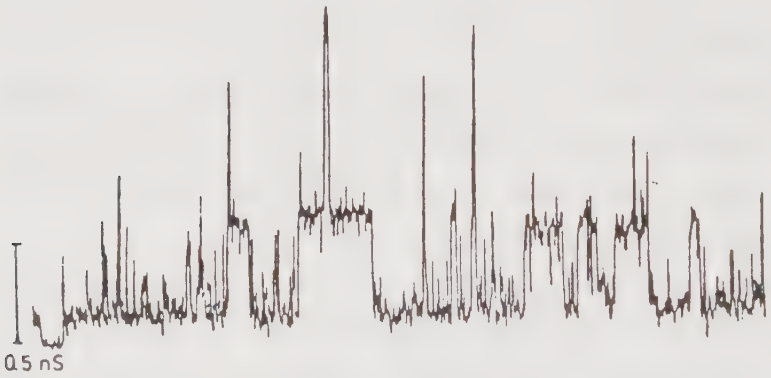


Abb. 6.2. Pore-state fluctuations of single Melittin pores at high ionic strength; c = 2 µg x cm^{-3}; membrane voltage 110 mV; Lipid 1,2-POPC; salt 5 M NaCl, pH = 6; Temp. 20 °C (60).

Nach Abspaltung (143) der C-terminalen Sequenz-(22-26) vom Melittin-(1-26) wurden auch die isolierten Melittinbruchstücke (1-21) derivatisiert und auf porenbildende Aktivitäten untersucht (60). (Tab. 6.2. und Tab. 6.3.).
Folgende Aussagen können aufgrund beschriebener und früherer Experimente gemacht werden:
Die Polypeptidantibiotika benötigen eine minimale Länge von ca. 18 Aminosäuren, welche einen α-helikalen, lipophilen N-Terminus und einen nichthelikalen, polaren C-Terminus

bilden müssen. Es sind aber auch wesentlich kürzere Peptide zur Induktion spannungsabhängiger Porensysteme befähigt. Dann sind aber wesentlich höhere Konzentrationen als bei Alamethicin erforderlich (144).

Die Aminosäure Aib ist nicht essentiell für die porenbildenden Eigenschaften der Peptidantibiotika. Aib hat jedoch einen α-helix-stabilisierenden Effekt (131).

Die Blockierung des N-Terminus durch einen Acetylrest und des C-Terminus durch einen Aminoalkohol ist nicht erforderlich.

Die positiven Ladungen am N-Terminus und an den Lysinresten haben keinen Einfluß auf den Mechanismus der Porenbildung, wie mit acetyliertem Melittin gezeigt werden konnte.

Porenbildung ist auch möglich ohne das von Fox und Richards für die Monomerenvernetzung als essentiell beschriebene Glutamin im N-Terminus. Poren werden auch von helikalen Peptiden der Sequenz Boc-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_n$-OMe (n = 1-4) (n = 1: 3_{10}-Helix, n = 2-3: α-Helix) gebildet.

Tab 6.2. Form der Porenbildung bei membranaktiven Polypeptidantibiotika und Melittin. VDC, voltage-dependent conductance; RPC, resolved pore-state conductances in 5 M NaCl.

Alamethicin F30	VDC, RPC
Alamethicin F50	VDC, RPC
Suzukacillin A	VDC, RPC
Melittin	VDC, RPC
Acetylated melittin	VDC, RPC
Trichotoxin A40	VDC
Trichotoxin A40 methyl ester	VDC

Trichotoxin A40 amide	VDC
Trichotoxin A40 hydrazide	VDC
Succinylated trichotoxin A40	VDC
Dansylated trichotoxin A40	VDC, RPC
Synthetic nonadecapeptide	VDC
Synthetic hexadecapeptide	inactive

Tab. 6.3. Melittin und derivatisierte Melittine, welche spannungsabhängige ionenleitende Poren in Lipiddoppelmembranschichten bilden; DC-System IX, detektiert mit Cl_2/TDM;

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
R^1-Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-
(R^2)
14 15 16 17 18 19 20 21
Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Try-Ile-Lys-R^3
(R^2)

Melittin-(1-26) R_F= 0,36	R^1= H od. For, r^2= H, R^3= Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH_2
Acetyliertes Melittin-(1-26) R_F= 0,47	R^1= Ac od. For, R^2= Ac, R^3= Arg-Lys(Ac)-Arg-Gln-Gln-NH_2
Melittin-(1-21) R_F= 0,47	R^1= H od. For, R^2= H, R^3= OH;
Acetyliertes Melittin-(1-21) R_F= 0,68	R^1= Ac od. For, R^2= Ac, R^3= OH;

7. Experimenteller Teil

7.1. Umkristallisation von Suzukacillin A

5,1 g Rohsuzukacillin (Mischung aus Suzukacillin A und B) werden in 50 ml Chloroform und 15 ml Aceton unter Erwärmen gelöst. Man gibt 150 ml Aceton dazu und läßt auskristallisieren. Die Ausbeute an Suzukacillin A beträgt 2,7 g. Das Produkt ist ein farbloses Pulver und schmilzt bei 259-261°C. R_F-Werte in DC-System VII (Sprühreagens Wasser):

Suzukacillin A = 0,16

Suzukacillin B = 0,50

7.2. Gelchromatographie an Sephadex LH 20 und Sephadex G 10

Bei der Molekularsiebchromatographie werden als Säulenfüllung Körner oder Perlen aus quervernetzten Dextranen (Sephadex) benutzt. Durch die Quervernetzung oder Polymerisation kann die Maschenweite so dimensioniert werden, daß Moleküle einer gewünschten Größe durch die meisten Poren nicht mehr hindurchtreten können. Trägt man diese Moleküle nun im Gemisch mit kleineren Molekülen auf, so können die hochmolekularen Anteile nicht in das Innere der Partikel einwandern, während die kleineren Moleküle das Gesamtvolumen der Säule durchwandern müssen und damit langsamer vorankommen (73). Um gute Trennergebnisse durch scharfe Trennzonen zu erhalten, ist es notwendig, die Säule gleichmäßig zu packen. Das Volumen der Säule hängt von der zu trennenden Stoffmenge ab. Speziell zum Abtrennen von Kieselgel bei Proben kleiner 5 mg erwiesen sich Pasteur-Pipetten als praktisch.

Die Säule sollte möglichst so dimensioniert sein, daß sie maximal zu dreiviertel mit Sorbens gefüllt ist. Am unteren Ende wird die Säule durch einen Glaswattepfropfen verschlossen, hierbei ist auch auf möglichst geringes Totvolumen am Säulenauslauf zu achten. Einwandfreie Säulenpackungen erhält man am leichtesten dadurch, daß man das nach Vorschrift vorgequollene Gel (74) mit dem vorgesehenem Elutionsmittel in das Trennrohr einschlämmt. Zweckmäßig gibt man schon vorher etwas Flüssigkeit in die Säule, gießt dann die Gel-Aufschlämmung in einem Guß in die Säule ein und läßt die mobile Phase vorsichtig wieder ablaufen. Für gleichmäßige Packungen ist es wichtig, die Säule blasenfrei zu füllen, was durch Klopfen des Säulenmantels erreicht wird. Nach ca. dreistündigem Equilibrieren wird die Probenmenge in so wenig wie möglich Elutionsmittel gelöst und aufgetragen. Es empfiehlt sich, zur Ausbildung einheitlicher Zonen die Probenlösung kreisförmig mit einer Pipette aufzutragen ohne die Oberfläche der Gelschicht aufzurühren. Das Elutionsmittel wird anfangs genauso vorsichtig wie die Probenlösung auf die Säule aufgetragen (75).Es wurde vorgequollenes Sephadex LH 20 und Sephadex G 10 der Firma Pharmacia Fine Chemicals verwendet. Das Säulenmaterial wurde nach jeder Trennung laut Vorschrift des Herstellers gereinigt[x]. Die Säulenchromatographie erfolgte unter Normaldruck. Als Fließmittelsysteme wurden System I, II und IV verwandt (Abschnitt 7.4.1.).

[x]Für Endreinigungen zu Bilayer-Membranexperimenten ist stets fabrikneues Gelmaterial zu verwenden.

7.3. Chromatographie an Kieselgel

Die Trennung der nach selektiver Acidolyse erhaltenen Partialsequenzen wurde durch Flüssigkeitschromatographie an Kieselgel-Fertigsäulen durchgeführt (76)(Lobar^{R} Fertigsäule Größe C, Kieselgel 60; Lichroprep^{R} Si 60; von E. Merck, Darmstadt). Diese Säulen wurden vor dem Eqilibrieren mit je 50 ml Methanol, Acetonitril, Aceton, Acetonitril, Methanol gereinigt.
Zunächst verdrängt man die Luft in der Säule mit dem Elutionsmittel, bis keine Blasen mehr entweichen und im Säulenfüllmaterial keine unbenetzten Stellen mehr sichtbar sind. Das hierzu benutzte Elutionsmittel sollte vorher selbst entgast werden. Wird mit hydrostatischem Druck gearbeitet, so empfiehlt es sich, die Säule über Nacht laufen zu lassen. Mit Hilfe einer Membranpumpe (Duramat) erreicht man eine vollständige Benetzung in 3-6 h, je nach Elutionsmittel und Fließgeschwindigkeit. Die Probe muß luftfrei aufgegeben werden, außerdem ist darauf zu achten, daß die Schlauchverbindungen^{x} von der Probeschleife über das Aufgabesystem zur Säule und zur Aufgabenspritze möglichst kurz sind. Das Füllen der Dosierschleife erfolgt über eine Aufgabespritze. Chromatographiert wurde bei Raumtemperatur, wobei chloroformhaltige Laufmittel ständig vorgekühlt wurden.
Die Fraktionen wurden mit einem Isco-Fraktionensammler auf-

^{x}Sehr wesentlich ist die ausschließliche Verwendung von Teflon-Schläuchen, da bei Verwendung anderer Schlauchmaterialien die Gefahr einer möglichen Kontamination mit Weichmachern wie Diisooctylphthalat besteht.

gefangen und dünnschichtchromatographisch detektiert. Um anfärbbare Konzentrationen zu erreichen, wurde pro Reagensglas 1 ml entnommen, das Lösungsmittel am Vakuum abgezogen und der Rückstand in 100 µl Methanol wieder aufgenommen. Hiervon wurden 10 µl auf Dünnschichtplatten aufgetragen und chromatographiert. Entsprechende Fraktionen wurden vereinigt. Nach dem Eindampfen wurde der Rückstand in tert.-Butanol unter Zusatz von wenig Wasser gelöst und lyophilisiert. Als Fließmittelsysteme fanden Verwendung System I,II, und VIII.
Herstellung und Chromatographie an selbstgefüllten Kieselgelsäulen siehe Abschnitt Gelchromatographie (Abschnitt 7.2.).

7.4. Dünnschichtchromatographie

An Kieselgel-Fertigplatten 60 F_{254} (Schichtdicke 0,2 mm, Nr.5719/5720 E. Merck, Darmstadt) werden punkt- oder strichförmig aufgetragene 0,5-1 proz. Lösungen von Substanzgemischen mit verschiedenen, hauptsächlich organischen Lösungsmitteln entwickelt. Die R_F - Werte wurden in frisch hergestellten Fließmittelsystemen in mit Fließpapier ausgelegten gesättigten Kammern (Camag, Muttenz, Schweiz) ermittelt.
Die getrennten Substanzen wurden durch UV-Licht (254 nm, 266 nm) oder Besprühen mit Nachweisreagentien sichtbar gemacht.

7.4.1. Fließmittelsysteme zur Dünnschichtchromatographie

I	$CHCl_3$/MeOH/AcOH/H_2O	65/25/3/4
II	$CHCl_3$/MeOH/AcOH/H_2O	35/45/3/4
III	$CHCl_3$/MeOH/17% NH_3	70/35/10
IV	$CHCl_3$/MeOH	50/50
V	Phenol/H_2O (g/g)	75/25
VI	1-Butanol/AcOH/H_2O	40/10/10
VII	$CHCl_3$/MeOH	10/4
VIII	Ethanol/H_2O	70/30
IX	1-Butanol/Pyridin/ AcOH/H_2O	30/20/6/24

7.4.2. Sprühreagentien

a) Wasser

Nach dem Besprühen der Dünnschichtplatte mit Wasser und vorsichtigem Antrocknen mit dem Kaltluftstrom eines Föhns heben sich lipophile Peptide und Lipide deutlich als weiße Flecke vom noch feuchten Untergrund ab.

b) Ninhydrin

0,5 g Ninhydrin wurden in 10 ml 1-Butanol unter Zusatz von 3 ml Eisessig gelöst (78).

c) Chlor/TDM-Reagens (79)

(TDM = 4,4-Tetramethyldiamino-diphenylmethan)

Lösung I 7,5 g TDM wurden in 30 ml Eisessig gelöst mit 150 ml Wasser verdünnt und filtriert.

Lösung II 15 g KI wurden in 300 ml Wasser gelöst.

Nach Mischen von I mit II ist das Reagens verwendbar und hält sich einige Wochen bei 5 °C. Zur Anfärbung wurden die trockenen DC-Platten 5-10 min in einen mit Chlorgas gefüllten Exsikkator gelegt und anschließend 5 min kalt geföhnt, um den größten Teil des adsorbierten Chlorgases zu entfernen. Nach dem Sprühen mit TDM erscheinen Peptide als grünblaue Flecken, deren Intensität nach einigen Minuten im Licht ein Maximum erreicht. Die Flecken von in Aluminiumfolie eingewickelten Platten sind einige Tage gut sichtbar, bevor eine Dunkelfärbung des Untergrundes eintritt.

d) Isatin (78)

Hierzu wurde eine 2 proz. Lösung von Isatin in 1-Butanol/Aceton (3:7, v/v) verwendet. Nach dem Eintauchen der Platten wurde 10 min bei 110 °C getrocknet. Alle Peptide mit freiem N-terminalem Prolin geben intensiv blaue Flecken auf gelbem Untergrund.

Die Anfärbereagentien a, b und c können nacheinander auf derselben Platte angewandt werden, wenn diese zwischen den einzelnen Anfärbeschritten gut getrocknet wird.

Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt und Fluka, Buchs bezogen. Lösungsmittel wurden, sofern nicht p.a. von diesen Firmen bezogen, nach üblichen Methoden absolutiert (80).

7.5. Aminosäurenanalysen

Das zu analysierende Peptid wurde in 1 ml 6 N HCl gelöst und bei 110 °C in zugeschmolzenen Glasampullen (Ø = 1 cm, l = 15 cm) 18 h hydrolysiert. Nach dem Eindampfen mit Hilfe

eines Rotationsverdampfers wurde der Rückstand in Natriumcitratpuffer gelöst und die Aminosäurenzusammensetzung mit dem automatischen Aminosäurenanalysator Biotronik LC 6000 E bestimmt (ca. 20 nMol pro Aminosäure im Einspritzvolumen). Da α-Aminoisobuttersäure nicht in üblichen Testmischungen für Aminosäurenanalysatoren enthalten ist, wurde eine Aib-Testmischung hergestellt und bei jeder Aib-Bestimmung miteingespritzt. Isovalin (Iva) konnte im Analysator nicht bestimmt werden, da es genau mit dem Valin-Peak eluiert wird, und, bedingt durch seine schlechte Anfärbbarkeit mit Ninhydrin, nur einen leicht erhöhten Valinwert verursacht.

7.6. Acidolyse von Suzukacillin A und Isolierung von Partialsequenzen

7.6.1. Trifluoracetolyse von Suzukacillin A

500 mg Suzukacillin A wurden in 50 ml wasserfreier Trifluoressigsäure gelöst und 3 h unter Verschluß bei 37 °C belassen. Anschließend wurde die gelbbraune Lösung im Vakuum eingedampft, der Rückstand zweimal in Dichlormethan aufgenommen und zur Trockene eingeengt. Nach mehrmaliger Lyophilisation aus tert.-Butanol/Wasser (4:1) wurden 591,45 mg bräunliches Pulver erhalten. In einem zweiten Ansatz mit achtstündiger Hydrolysedauer betrug die Ausbeute 565 mg Hydrolysat (Tab. 7.1. und 7.2.).
Bei der dreistündigen Hydrolyse wurden 245 mg unhydrolysiertes Suzukacillin A wiedergewonnen; damit wurde eine Nachhydrolyse (18 h) durchgeführt (Tab. 7.3.). Die bei der

achtstündigen Hydrolyse unzersetzten Suzukacillin A - Fraktionen (178 mg) wurden einer achtstündigen Nachhydrolyse unterzogen (Tab. 7.4.).

7.6.1.1. Säulenchromatographie an Kieselgel

Das Lyophilisat der Trifluoracetolyse-Produkte wurde in 2 ml System I gelöst und über Kieselgel (Kieselgel 60, Lobar Fertigsäule, Größe C, Merck) chromatographiert (Aufgabesystem mit Probeschleife, Duramat Membranpumpe, 1,4 bar; Isco-Fraktionensammler). Die Säule wurde vorher mit dem zur Trennung verwendeten Laufmittelsystem I 3 h equilibriert. Die Fraktionen (10-15 ml) wurden dünnschichtchromatographisch (Kieselgel-Fertigplatten Nr. 5719, Merck, System I) mit den Reagentien Cl_2/TDM, Isatin und Ninhydrin untersucht. Sequenzen mit N-terminalem Prolin konnten durch Gelbfärbung mit Ninhydrin und Blaufärbung mit Isatin identifiziert werden. Weitere Angaben sind aus Tabelle 7.1.-7.4. zu entnehmen.

Tab. 7.1. Fraktionierung und Charakterisierung der durch Hydrolyse (3 h) von Suzukacillin A (500 mg) erhaltenen Partialsequenzen

Nr.	Elutions- vol. (ml)	Menge (mg)	Anfärbereagentien 1	2	3	Hauptkomponente
1-2	80-380	245	-	-	±	Suzukacillin A, acetylierte Peptide
3	380-530	17	-	-	±	acetylierte Peptide
4	530-680	1	-	(-)	+	Ac-Aib-OH
5	680-830	11,5	blau	rot/gelb	+	Prolyltetrapeptid-(14-17)
6-8	830-1180	14,9	blau	rot/gelb	+	Prolyltetrapeptid-(14-17)
9-10	1180-1480	4,5	blau	rot/gelb	+	
11	1480-1630	4	blau	rot/gelb	+	
12-14	1630-2080	20	blau	gelb	+	Prolylheptapeptid-(14-20) und Ninhydrin positive Peptide
15-21	2080-3130	24,7	blau	rot/gelb	+	Prolylheptapeptid-(14-20) und Ninhydrin positive Peptide
22-32	3130-4630	59	-	rot/gelb	+	Prolylheptapeptid-(14-20) und Ninhydrin positive Peptide
		401,6 (80 %)				

Tab. 7.2. Fraktionierung und Charakterisierung der durch Hydrolyse (8 h) von Suzukacillin A (500 mg) erhaltenen Partialsequenzen

Nr. I	Elutions- vol. (ml)	Menge (mg)	Anfärbereagentien 1	2	3	Hauptkomponente
1-3	80-530	178	-	-	±	Suzukacillin A
4	530-680	39,3	-	rot	+	Nonadekapeptide, Dodekapeptide
5-6	680-980	34,3	(-)	rot	+	Ac-Aib-OH
7-8	980-1280	33	blau	rot/gelb	+	Prolyltetra-,
9-12	1280-1880	127	blau	rot/gelb	+	Prolylhepta-,
12-14	1880-2330	30	blau	rot/gelb	+	Ninhydrin posi-
15	2330-2480	10	(+)	rot/gelb	+	tive Peptide
15-17	2480-2780	-	-	-	(+)	
		452 (90 %)				

1 = Isatin, 2 = Ninhydrin, 3 = TDM;

Tab. 7.3. Fraktionierung und Charakterisierung der durch Hydrolyse (18 h) von Suzukacillin A (245 mg) erhaltenen Partialsequenzen; (Fraktion 1-2 aus Tab. 7.1.).

Nr.	Elutions-	Menge	Anfärbereagentien			Hauptkomponente
	vol. (ml)	(mg)	1	2	3	
1	60-270	68,4	-	-	+	SZ A, (Aib-Ala-Aib)
2	270-300	9,9	(+)	+	+	Prolyltetra-, Dodekapeptide Gly-Leu-Aib
3	300-340	15,1	(+)	+	+	
4	340-360	18	blau	+	+	Prolylhepta-, Dodekapeptide Gly-Leu-Aib
5	360-400	16	(+)	+	+	
6	400-700	29	-	(-)	(+)	Aib-Aib
7	700-900	10	-	-	(+)	
		166,5 (68 %)				

Tab. 7.4. Fraktionierung und Charakterisierung der durch Hydrolyse (8 h) von Suzukacillin A (178 mg) erhaltenen Partialsequenzen; (Fraktion 1-3 aus Tab. 7.2.).

Nr. II	Elutions- vol. (ml)	Menge (mg)	Anfärbereagentien 1	2	3	Hauptkomponente
1	70-130	14	-	-	+	Suzukacillin A
2	130-175	109	-	-	±	Suzukacillin A acetyliertes Tridekapeptid-(1-14)
3	175-240	34	-	-	+	
4	240-300	1		(-)	+	
5	300-360	4		+	+	
6	360-420	1		(+)	(+)	
7	420-480	-		-	-	

1 = Isatin, 2 = Ninhydrin, 3 = TDM

7.6.2. Isolierung der Prolylpeptide 1 und 2

7.6.2.1. Chromatographie an Kieselgel und Sephadex LH 20

Tab. 7.5. Fraktionen, die Peptide mit N-terminalem freiem Prolin enthalten[x]

Nr.	ml	mg	Isatin	Ninhydrin	TDM	Hauptkomponente
3 h - Trennung						
11	150	4	blau	gelb	+	Prolylheptapeptid 1
12-14	450	20	"	"	+	
15-21	1050	24,7	"	"	+	
5	300	11,5	"	"	+	Prolyltetrapeptid 2
8 h - Trennung I						
9-12	600	127	"	"	+	Prolylheptapeptid 1
12-14	450	30	"	"	+	Prolyltetrapeptid 2

[x]In allen Fraktionen befinden sich zusätzlich Ninhydrin-positiv anfärbende N-terminale Fragmente und Spuren von Suzukacillin A

Prolylheptapeptid 1

Das Aufreinigen der Prolylpeptide mußte der Zusammensetzung der miteluierten Peptidsequenzen angepaßt werden. Suzukacillin A und längere Sequenzen wurden über Sephadex LH 20 und Sephadex G 10 (System I) entfernt. Schwierigkeiten bereitete das Abtrennen von kleineren, mit Ninhydrin anfärbbaren Fragmenten oder von Pro-Val-Aib-Iva. Durch Säulenchromatographie an Kieselgel (System VIII) ließen sich Teile dieser Komponenten entfernen und das Prolylheptapeptid nachfolgend mit System I eluieren. Kleinere Mengen wurden an-

schließend durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt (System VIII) und an Sephadex LH 20 (System IV) von Kieselgelresten befreit. Aus mehreren Fraktionen ließen sich insgesamt 17 mg reines Prolylheptapeptid gewinnen.

Prolyltetrapeptid 2

Aus 11,5 mg (Fraktion 5, Tab. 7.1.) wurde durch Chromatographie an Kieselgel (System II) 5 mg eines Tetrapeptids gewonnen. Auf der DC-Platte ließ sich dieses mit System II in zwei eng beisammenlaufende, mit Ninhydrin gelb anfärbbare Flecke trennen. Durch präparative Dünnschichtchromatographie konnten 4 mg Prolyltetrapeptid gewonnen werden. Die noch verunreinigte zweite Fraktion wurde wegen zu geringer Menge nicht weiter gereinigt.

7.6.2.2. Aminosäurenzusammensetzung der Prolylpeptide

Tab. 7.6. Aminosäurenanalyse eines Totalhydrolysates von Pro-Val-Aib-Aib(Iva)-Gln-Gln-Pheol (6 N HCl, 18 h, 110 °C); Biotronik-Aminosäurenanalysator LC 6000 E, Ninhydrin-Anfärbung, λ = 570 nm (Prolin 440 nm).

	Prolylheptapeptid 1 (14-20)	Prolyltetrapeptid 2 (14-17)
Pro	1	1
Val	1	1
Aib	1,42	1,42
Glu	2	-
NH_3	1	0,2

7.6.3. Isolierung des Dodekapeptids und von Gly-Leu-Aib

7.6.3.1. Chromatographie an Kieselgel und Sephadex LH 20

Tab. 7.7. Fraktionen mit lipophilen, Ninhydrin rot anfärbenden Fragmenten

Nr.	ml	mg	Isatin	Ninhydrin	TDM	Hauptkomponente
18 h - Trennung						
2	30	9,9	blau	rot	+	Prolyltetrapeptid
3	40	15,2	"	"	+	Gly-Leu-Aib
4	20	18	"	"	+	Dodekapeptide
5	40	16	"	"	+	
8 h - Trennung I						
5-6	300	34,3	-	"	+	Dodekapeptide

Die Fraktionen 2-5 enthielten je drei ninhydrinpositive Substanzen, von denen eine rot und zwei gelb anfärbten. Fraktion 2 und 3 sowie Fraktion 4 und 5 wurden an Sephadex LH 20 (System I) chromatographiert. Drei Fragmente konnten isoliert werden. Das Prolylpeptid wurde durch Aminosäurenanalyse und R_F-Wert-Vergleich als Pro-Val-Aib-Iva bestimmt und nicht weiter gereinigt. Die beiden restlichen Substanzen wurden jede für sich noch einmal an Sephadex G 10 (System IV) chromatographiert. Die Ausbeute an Dodekapeptid betrug 8 mg. Von der mit Ninhydrin gelborange anfärbenden Substanz Gly-Leu-Aib konnten 4,2 mg isoliert werden.

Abb. 7.1. Dünnschichtchromatogramm der isolierten Fragmente Pro-Val-Aib-Iva 2, Gly-Leu-Aib 3 und des Dodekapeptids 1; (System I, Detektion mit Ninhydrin)

7.6.3.2. Aminosäurenanalyse des Dodekapeptids und von Gly-Leu-Aib

Tab. 7.8. Aminosäurenanalyse eines Totalhydrolysates von Ala-Aib-Ala-Aib-Ala(Aib)-Gln-Aib-Aib(Leu)-Aib-Gly-Leu-Aib und Gly-Leu-Aib (Bedingungen wie Tab. 7.6.)

	Dodekapeptid-(2-13)	Gly-Leu-Aib (11-13)
Aib	6	1,08
Gly	1	1
Leu	1,42	0,95
Ala	2,63	-
Glu	1,3	-
NH_3	0,8	0,15

7.6.4. Isolierung des Nonadekapeptids-(2-20)

7.6.4.1. Chromatographie an Sephadex LH 20 und Kieselgel

Fraktion Nr.	ml	mg	Isatin	Ninhydrin	TDM	Hauptkomponente
8 h - Trennung I						
4	150	39,3	-	rot	+	Nonadekapeptid

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung (System I) in höheren Konzentrationen zeigte, daß in Fraktion 4 außer einer mit Ninhydrin rot anfärbenden Substanz auch eine mit Ninhydrin gelbfärbende Sequenz und unhydrolysiertes Suzukacillin A vorhanden waren. Mehrmalige Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 (System I) ergab 12 mg Nonadekapeptid-(2-20). Die mit Ninhydrin gelb anfärbbare Substanz wurde als Pro-Val-Aib-Iva identifiziert.

7.6.4.2. Aminosäurenanalyse des Nonadekapeptids(Bedingungen wie Tab. 7.6.)

	Nonadekapeptid-(2-20)
Leu	1.18
Val	1,25
Aib	7
Ala	2,75
Gly	1
Pro	0,9
Glu	3,07
NH_3	1,9

7.6.5. Isolierung des N-acetylierten Tridekapeptids-(1-13)

7.6.5.1. Chromatographie an Kieselgel und Sephadex LH 20

Tab. 7.9. Fraktionen mit lipophilen, nicht mit Ninhydrin anfärbbaren Fragmenten

Nr	ml	mg	Isatin	Ninhydrin	TDM	Hauptkomponente
8 h - Trennung I						
2	45	109	-	-	+	Suzukacillin A
3	75	34	-	-	+	N-Ac-Tridekapeptid

Fraktion 2 wurde an Sephadex LH 20 (System II) chromatographiert (Abb.7.2.). Die aus der Trennung erhaltene Fraktion 8 wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie (System III) aufgetrennt. Es ließen sich 30 mg Nr. 3, 3 mg Nr. 1 und 2 mg Nr. 2 isolieren (Abb. 7.3.).

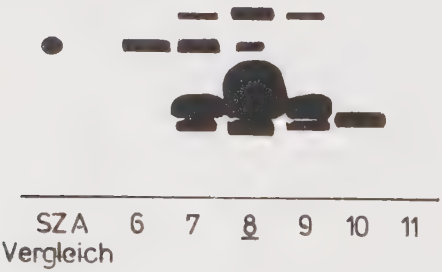


Abb. 7.2. Säulenchromatographische Trennung von 109 mg N-acetylierter Fragmente und Suzukacillin A an Sephadex LH 20 (System II); DC-System III, detektiert mit H_2O.

Abb. 7.3. Dünnschichtchromatographischer Vergleich der aus Fraktion 8 (Abb. 7.2.) durch präparative DC (System III) isolierten Sequenzen 1, 2 und 3 (Tridekapeptid-(1-13).

7.6.5.2. Aminosäurenanalyse des N-acetyl-Tridekapeptids (Bedingungen wie Tab. 7.6.)

	N-acetyl-Tridekapeptid-(1-13)
Leu	0,9
Val	-
Aib	7,45
Ala	2,76
Gly	0,9
Pro	-
Glu	1
NH_3	1,9

7.6.6. Isolierung von Aib-Ala-Aib und Aib-Aib

7.6.6.1. Chromatographie an Kieselgel und Sephadex LH 20

Nr.	ml	mg	Isatin	Ninhydrin	TDM	Hauptkomponente
18 h-Trennung						
1	210	68,4	-	(+)	+	Suzukacillin A
6	300	29	-	(-)	(+)	"

Fraktion 1 enthielt 4-5 mit Wasser detektierbare Substanzen (DC-System III) und 2-3 ganz schwach mit Ninhydrin rot anfärbbare Substanzen. Hauptbestandteile der Probe waren unzersetztes Suzukacillin A und N-acetylierte Peptide, welche mit Sephadex LH 20 (System II, Säulenlänge 1,3 m) nicht auftrennbar waren. Abtrennbar war jedoch eine schwach mit Ninhydrin rot anfärbende Substanz, die zuletzt von der Säule eluiert wurde. Die Ausbeute betrug 2 mg. Die Aminosäurenanalyse der noch verunreinigten Probe enthält Aib, Ala und Spuren von Glu. Dieses Peptid erwies sich durch GC-MS Analyse als Aib-Ala-Aib.

Fraktion 6 enthielt zwei ninhydrinpositive Substanzen und Spuren eines Prolylpeptides. Auf Sephadex LH 20 (System II, Säulenlänge 1,3 m) konnte eine mit Ninhydrin rot anfärbende Verbindung isoliert werden. Die Ausbeute betrug 5 mg. Die Aminosäurenanalyse ergab nur α-Aminoisobuttersäure. Die Sequenz wurde durch kombinierte GC-MS Analyse als Aib-Aib bestimmt.

7.7. Sequenzierung durch Gaschromatographie-Massenspektroskopie

Die Reihenfolge der Aminosäuren in den aus Suzukacillin A isolierten Sequenzen wurde durch kombinierte GC-MS ermittelt (81). Zur Sequenzierung werden die erhaltenen Fragmente durch Einwirkung von 12 N HCl in ein Gemisch von Peptiden verschiedener Kettenlänge zerlegt. Die nachfol-

gende Veresterung und Trifluoracetylierung wurde nach F. Weygand et al. durchgeführt (82). Die so erhaltene Mischung leichtflüchtiger N,O-acetylierter Peptidester wurde gaschromatographisch getrennt und durch ein direkt mit dem Gaschromatograph gekoppeltes Massenspektrometer untersucht. Kürzere Peptide wurden ohne vorhergehende Hydrolyse untersucht.
Für die gaschromatographischen und massenspektroskopischen Untersuchungen wurde ein Kombinationsgerät Typ Massenspektrometer Varian MAT 311 A benutzt. Die Bedingungen der Gaschromatographie und der Massenspektroskopie sind den Abbildungen zu entnehmen.

7.8. Felddesorptions-Massenspektroskopie (83)

Die Proben wurden in möglichst wenig Methanol gelöst, auf Kohlenstoff-Whiskers (Wolframdraht) aufgetragen und mit dem Gerät Modell Varian MAT 711 untersucht. Die Bedingungen der Massenspektroskopie sind den einzelnen Abbildungen zu entnehmen.

7.9. Fast Atom Bombardment (FAB) (84-86)

Die Spektren wurden mit einem Gerät Modell Vacuum Generators, ZAB 2F aufgenommen. Beschleunigungsspannung 8 kV, Xenon Atomkanone, Matrix Glycerin.

7.10. Nachweis des L-Phenylalaninols durch Gaschromatographie

Eine Probe (1 mg) des Prolylheptapeptids-(14-20) wurde mit 6 N HCl (18 h, 110 °C) hydrolysiert, das Pheol im getrock-

neten Hydrolysat mit Pentafluorpropionsäureanhydrid (10 min, 110 °C) N,O-acyliert und zusammen mit einer Standardlösung aus D/L - Pheol chromatographiert. Die Zunahme des vor dem D-Pheol-Peak erscheinenden L-Pheol-Peaks zeigt L-Pheol im untersuchten Heptapeptid. Bedingungen: Gerät Carlo Erba 2100, Glaskapillarsäule Chirasil-Val (20 x 0,3 mm), Trägergas H_2, Temperaturprogramm 3 °C/min bis 80 °C, 4 °C/min bis 190 °C.

7.11. DC-Vergleich natürlicher und synthetischer C-Termini von Suzukacillin A und Alamethicin F30

Je 1 mg Suzukacillin A, Alamethicin F30 und Alamethicin F50 wurde in 100 ul TFA/CH_2Cl_2 (1:1) bei 37 °C 3 h hydrolysiert. Das Lösungsmittel wurde im N_2-Strom abgeblasen, der Rückstand zweimal in CH_2Cl_2 aufgenommen und zur Trockene eingeengt. Die Partialhydrolysate sowie die isolierten und synthetischen C-Termini wurden in System III chromatographiert und die Prolylpeptide spezifisch mit Isatin angefärbt.

7.12. Circulardichroismus zur Bestimmung der Sekundärstruktur

Alle CD-Spektren wurden mit einem Roussel-Jouan-Dichrograph Modell CD 185 unter Stickstoff aufgenommen und einmal wiederholt. Gemessen wurde in Küvetten der Schichtdicke

l = 0,01 cm, 0,05 cm und 0,1 cm in Methanol. Die Einwaagen lagen in der Größenordnung von c = 1 mg/ml. Der Gehalt an Peptid wurde mit Hilfe einer quantitativen Aminosäurenanalyse bestimmt.

Gleichung 1 $\quad \Theta(\lambda) = 3298 \times \frac{S}{c \times l} \times d(\lambda)$

$$\left[\text{Grad cm}^2 \text{ dmol}^{-1}\right]$$

S = Empfindlichkeit des Gerätes
c = Konzentration (mol/l)
l = Schichtdicke in cm
d = Abstand der gemessenen Kurve von der Nullinie in mm
Weitere Aufnahmeparameter: Geschwindigkeit 0,125 x 0,5, Zeitkonstante 4;

Die nach Gleichung 1 ermittelten Θ - Werte wurden durch die Anzahl der Aminosäurenreste im Peptid geteilt. Daraus ergeben sich die sogenannten Θ_m-Werte (mean residue ellipticities).

7.13. ^{13}C-NMR-Spektroskopie

Die ^{13}C-NMR-Spektren wurden an einem WM 400 Spektrometer (100,62 MHz) der Firma Bruker aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf $CDCl_3$ (77 ppm). Als Lösungsmittel wurde $^{12}CD_3OD/^{12}CDCl_3$ (1:1, v/v) verwendet. Gemessen wurde in Probenröhrchen mit einem Durchmesser von 5 mm, die Temperatur betrug 303 K.

7.14. Derivate der Bienengift-Komponente Melittin

7.14.1. Acetyliertes Melittin-(1-26)

5 mg Melittin wurden in 0,5 ml wasserfreiem Dimethylformamid unter Zusatz von etwas Triethylamin (pH = 8) gelöst und durch Zugabe von 35 µl Acetanhydrid (146) acetyliert. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung an Sephadex G 75 chromatographiert (System: 0,5 proz. AcOH, Säulenlänge 50 cm). Nach Lyophilisation aus tert.-Butanol/Wasser (4:1) erhielt man 3,7 mg acetyliertes Melittin. Das Produkt war gut wasserlöslich und nicht mit Ninhydrin anfärbbar (Tab. 7.10.).

Nach derselben Methode wurden 0,4 mg Melittin-(1-21) acetyliert. Da auf Grund der geringen Substanzmenge keine Chromatographie an Sephadex G 75 durchgeführt werden konnte, wurde die Probe mehrmals aus tert.-Butanol/Wasser (4:1) lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 0,35 mg acetyliertes Melittin-(1-21); dieses ist nicht mit Ninhydrin anfärbbar.

7.15. Derivate des Trichotoxin A-40

7.15.1. Dansyl-Trichotoxin A-40

3 mg Trichotoxin A-40-hydrazid (88) wurden in 50 µl abs. Methanol gelöst und 1 mg 5-Dimethylaminonaphtalin-1-sulfochlorid (Merck, Nr. 3094) zugegeben. Nach 3 h wurde die Reaktionsmischung an Sephadex LH 20 (System II, Säulenlänge 25 cm, ∅ = 2 cm) chromatographiert. Die Ausbeute betrug 2 mg eines dünnschichtchromatographisch einheitlichen, im UV-Licht fluoreszierenden Dansyl-Trichotoxin A-40 Derivates (Tab.7.10.).

Tab. 7.10. R_F-Werte der Melittin- und Trichotoxin Derivate sowie der isolierten Suzukacillin A Fragmente in den DC-Systemen I, II, III und IX (Kieselgel 60 F_{254}, 10x20 cm, 0,2 mm; E. Merck, Darmstadt).

	DC-System			
	I	II	III	IX
Melittin-(1-26)				0,22
Ac-Melittin-(1-26)				0,67
Melittin-(1-21)				0,47
Ac-Melittin-(1-21)				0,68
Trichotoxin A-40			0,37	
Trichotoxin A-40-methylester			0,65	
Trichotoxin A-40-hydrazid [x]			0,57	
Dansyl-Trichotoxin A-40			0,58	
Suzukacillin A	0,48	0,86	0,46	
Ac-Aib-OH	0,51	0,89	-	
Nonadekapeptid-(2-20)	0,23	0,72	0,46	
Ac-Tridekapeptid-(1-13)	0,52	0,96	0,28	
Dodekapeptid-(2-13)	0,20	0,78	0,21	
Prolylheptapeptid-(14-20)	0,16	0,42	0,53	
Prolyltetrapeptid-(14-17)	0,21	0,54	0,32	
Gly-Leu-Aib	0,13	-	-	
Aib-Ala-Aib	0,11	0,40	0,10	
Aib-Aib	0,11	0,40	0,10	

[x] Blaue Anfärbung des Hydrazids mit Barton's Reagens ($FeCl_3/K_3[Fe(CN)_6]$ (78).

7.16. Synthese des C-terminalen Prolylheptapeptids von Suzukacillin A

7.16.1. H-Gln-Pheol

Z-Gln-Pheol (R_F(II) = 0,89) (3g, 7,25mmol) wurde in Methanol/Wasser (4:1) (100 ml) gelöst und in Gegenwart von Pd-Aktivkohle (10 %, 0,3g) ohne Säurezusatz hydriert. Nach 2,5h bei 35° C wurde nochmals etwas Katalysator zugegeben. Nach vollständiger Abspaltung der Z-Gruppe (4-5h) wurde filtriert und das Lösungsmittel am Vakuum abgezogen. Das dünnschichtchromatographisch reine Amin wurde ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet. Ausbeute 2,73g (91%); R_F(II) = 0,51.

7.16.2. Z-Gln-Gln-Pheol

Z-Gln-OH (R_F(II) = 0,61) (2,8g, 10mmol) wurde in DMF gelöst und mit 4-Methylmorpholin (1,15ml, 10mmol) versetzt. Nach Zugabe von Chlorameisensäurebutylester (1,33ml, 10mmol) bei -20° C wurde nach 15 min H-Gln-Pheol (2,7g, 10mmol) in DMF so zugegeben, daß die Temperatur unter -13° C blieb. Nach 30 min bei -10° C und langsamem selbständigen Erwärmen auf Raumtemperatur fällt dünnschichtchromatographisch reines Z-Gln-Gln-Pheol aus. Das äußerst schwerlösliche Z-Gln-Gln-Pheol wurde abfiltriert, getrocknet und ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet. Ausbeute 5,1g (94%); R_F(II) = 0,82.

7.16.3.H-Gln-Gln-Pheol

Z-Gln-Gln-Pheol (1,5g, 2,8mmol) wurde in Eisessig (100ml) gelöst und in Gegenwart von Pd-Aktivkohle (10%, 150mg) bei 0° C 3h hydriert. Nach vollständiger Abspaltung der Z-Gruppe wurde filtriert und anschließend das Filtrat lyophilisiert. Das gut wasserlösliche Lyophilisat wurde noch zweimal aus schwach ammoniakalischer Lösung (pH 7-8) lyophilisiert um Rückstände von Eisessig zu entfernen. Ausbeute 0,8g (51%); R_F(II) = 0,18.

7.16.4.Boc-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol

Boc-Val-Aib-Aib-OH (103) (312mg, 0,64mmol) und HOBt (87mg, 0,64mmol) wurden in DMF (1ml) gelöst und mit DCC (0,64mmol) bei 37-40° C voraktiviert. Nach 30 min wurde H-Gln-Gln-Pheol (260,5mg, 0,64mmol) und 4-Methylmorpholin (0,64 mmol, 74µl) in DMF (50ml, zum Teil ungelöst) zugegeben. Nach 48h bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel am Vakuum abgezogen. Die säulenchromatographische Trennung an Sephadex LH 20 in Methanol/Chloroform (1:1) lieferte dünnschichtchromatographisch reines Boc-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol. Für analytische Zwecke wurde 20mg Prolylheptapeptid aufgereinigt. R_F(I) = 0,51. Aminosäurenanalyse: Pro (1), Val (1), Aib (2), Glu (2).

8. Zusammenfassung

Suzukacillin A ist ein vom Stamm Trichoderma viride 63 C-I isoliertes Polypeptidantibiotikum, welches spannungsabhängige ionenleitende Poren in künstlichen und natürlichen Lipidmembranen bildet. Die Isolierung von Suzukacillin A erfolgte durch Umkristallisation eines bereits vorgereinigten Rohproduktes aus Suzukacillin A und B.

Die Ermittlung der Sequenz wurde erschwert durch die Blockierung des N-Terminus mit einem Acetylrest und des C-Terminus mit einem Aminoalkohol, insbesondere aber durch die natürliche Mikroheterogenität des Peptids. Die durch den hohen Gehalt von α-Aminoisobuttersäure verursachte Resistenz gegen Peptidasen schloß enzymatische Abbaumethoden aus.

Durch selektive Trifluoracetolyse konnten Partialsequenzen erhalten werden, die anschließend in Zusammenarbeit mit Prof. W.A. König, Universität Hamburg, massenspektrometrisch sequenziert wurden.

Isoliert werden konnten die N-terminalen Fragmente Nonadekapeptid-(2-20), Tridekapeptid-(1-13), Dodekapeptid-(2-13), ein C-terminales Prolylheptapeptid-(14-20) und Prolyltetrapeptid-(14-17) sowie Di- und Tripeptide.

Die präparative Isolierung dieser Fragmente erfolgte mittels Kieselgel- und Sephadex LH 20 - Säulenchromatographie.

Durch gaschromatographisch - massenspektrometrische Analysen von trifluoracetylierten und veresterten Partialhydrolysaten

wurde folgende Sequenz von Suzukacillin A mit drei Aminosäureaustauschstellen, ^{6}Ala/^{6}Aib, ^{9}Aib/^{9}Leu und ^{17}Aib/^{17}Iva ermittelt:

Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Aib-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-
(Aib) (Leu)

Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
(Iva)

Durch Vergleich mit synthetisch hergestelltem Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol (103) und synthetischem Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol konnte dem aus Suzukacillin A isoliertem C-Terminus die Sequenz Pro-Val-Aib-Aib(Iva)-Gln-Gln-Pheol zugeordnet werden.

Die Molmasse der einzelnen Fragmente und von Suzukacillin A wurden durch FAB- und FD-Massenspektren bestimmt. Daraus ergaben sich 8 Sequenzanaloga des Suzukacillin A, die sich aus je 19 Aminosäuren und einem Phenylalaninol zusammensetzen. Damit gehört Suzukacillin A zu den größten bekannten Peptidantibiotika.

Die L-Konfiguration der Aminosäuren und des Phenylalaninols wurde durch Gaschromatographie an chiraler Phase bestimmt. Die D-Konfiguration des Isovalins wurde bereits früher von Brückner et al. nachgewiesen.

An Suzukacillin A, dem N-terminalen Tridekapeptid-(1-13) und C-terminalen Prolylheptapeptid-(14-20) sowie den synthetischen Prolylheptapeptiden konnten ^{13}C-NMR-Untersuchungen durchgeführt werden. Sowohl die ^{13}C-NMR - als auch CD - Untersuchungen zeigten, daß der N-Terminus (13 Aminosäuren) den α-helikalen Teil des Moleküls bildet und der mit Pro-

lin beginnende C-Terminus in einer nicht-helikalen, jedoch fixierten Struktur vorliegt.

CD-Messungen an der Bienengiftkomponente Melittin und an acetyliertem Melittin bestätigten ebenfalls das Vorliegen helikaler Konformationen.

Partialsequenzen des Suzukacillin A sowie Derivate von Trichotoxin A40 und Melittin wurden in Zusammenarbeit mit Prof.G. Boheim, Universität Bochum, an Lipiddoppelschichtmembranen untersucht. Dabei zeigte das aus Suzukacillin A isolierte Prolylheptapeptid-(14-20) keine membranmodifizierenden Eigenschaften.

Sowohl Melittin und seine Derivate als auch C-terminal dansyliertes Trichotoxin A40-hydrazid und das aus Suzukacillin A isolierte Nonadekapeptid-(2-20) zeigen spannungsabhängige Ionenleitung in planaren Lipiddoppelschichtmembranen.

9. Literaturverzeichnis

1) Ooka, T., Shimojima, Y., Akimoto, T., Takeda, I., Senoh, S. und Abe, J. (1966) Agr. Biol. Chem. 30, 700-702.

2) Japanisches Patent Nr. 13795 (1965); Chem. Abstr. 63, 17092 c.

3) Ooka, T. und Takeda, I. (1972) Agr. Biol. Chem. 36, 112-119.

4) Ooka, T. und Takeda, I. (1974) Agr. Biol. Chem. 38, 19-27.

5) G. Boheim, K. Janko, D. Leibfritz, T. Ooka, W.A. König und G. Jung (1976) Biochim. Biophys. Acta 433, 182-199.

6) G. Jung, W.A. König, D. Leibfritz, T. Ooka, K. Janko und G. Boheim (1976) Biochim. Biophys. Acta 433, 164-181.

7) Japanisches Patent Nr. 750517 (1975); Chem. Abstr. 83, 37917.

8) P. Meyer und F. Reusser (1967) Experentia 23, 85-86.

9) Französisches Patent Nr. 1511185 (1968) Chem. Abstr. 70, 95471.

10) A. I. McMullen (1970) Biochem. J. 119, 10 P - 11 P.

11) J. W. Payne, R. Jakes und B. S. Hartley (1970) Biochem. J. 117, 757-766.

12) Y.A. Ovchinnikov, A.A. Kiryshkin und I.V. Kozhevnikova (1971) Zhurnal Obshchei Khimii 41, 2085-2099; J. Gen. Chem. USSR (1971) 41, 2105-2116.

13) D.R. Martin und R.J.P. Williams (1975) Biochem. Soc. Trans., Proc. 533 rd Meeting, Vol. 3, 166-167.

14) D.R. Martin und R.J.P. Williams (1976) Biochem. J. 153, 181-190.

15) G. Jung, N. Dubischar, D. Leibfritz, M. Ottnad, H. Probst und C. Stumpf (1975) in Peptides 1974, Proceedings of the 13 th European Peptide Symposium, Y.Wolmar, (Ed.),Wiley, New York, N.Y. (1975) pp. 345-354.

16) G. Jung, N. Dubischar, G. Irmscher, W. Mayr und R. Oekonomopulos (1977) Chemiker Ztg. 101, 196-201.

17) G.Irmscher (1977) Dissertation, Universität Tübingen

18) G. Jung und G. Irmscher (1977) Eur. J. Biochem. 80, 165-174.

19) R.C. Pandey, J.C. Cook und K.L. Rinehart (1977) J. Amer. Chem. Soc. 99, 8469-8483.

20) D. Meena, A.R. Laddu und R.K. Saryal (1967) Current Sci. 36, 347-348.

21) Französisches Patent Nr. 1460217 (1966), Chem. Abstr. 67, 107379.

22) M.J. Thirumalachar, C.V. Rhadhakrishnan und A.B.P. Vores, (1966) Hindustan Antibiot. Bull. 8, 201-204.

23) M.J. Thirumalachar (1968) Hindustan Antibiot. Bull. 10, 287-289.

24) Deshmukh, P.V. und Vaidya, M.G. (1968) Nature 217, 849.

25) M.G. Vaidya, P.V. Deshmukh and S.N. Chari (1968) Hindustan Antibiot. Bull. 11, 81-89.

26) K.L. Rinehart, H. Meng, K.L. Olson, J.C. Cook und R.C. Pandey (1977) Nature 269, 832-833.

27) R.C. Pandey, H. Meng, J.C. Cook und K.L. Rinehart (1977) J. Amer. Chem. Soc. 99, 5203-5205.

28) R.C. Pandey, J.C. Cook und K.L. Rinehart (1978) J. Antibiot. 31, 241-243.

29) G. Werner, (1977) Diplomarbeit, Universität Tübingen

30) K. Sasaki, H. Minato, K. Katagiri, S. Hayakawa und T. Matsushima (1971) J. Antibiot. 24, 67-68.

31) C.T. Hou, A. Ciegler und C.W. Hesseltine (1972) Appl. Microbiol. 23, 183-185.

32) A.D. Argoudelis und L.E. Johnson, (1974) J. Antibiot. 27, 274-282.

33) R.C. Pandey, J.C. Cook und K.L. Rinehart (1977) J.Amer. Chem. Soc. 99, 5205-5206.

34) A.D. Argoudelis, A. Dietz und L.E. Johnson (1974) J. Antibiot. 27, 321-328.

35) N. Inoue, A. Inoue, M. Furukawa und N. Kanda (1976) J. Antibiot. 29, 618-622.

36) Japanisches Patent Nr. 7336200 (1973) Chem. Abstr. 79, 35134.

37) C. Dennis und J. Webster (1971) Trans. Br. mycol. Soc. 57, 25-39.

38) G. Irmscher, G. Bovermann, G. Boheim und G. Jung (1978) Biochim. Biophys. Acta 507, 470-484.

39) G. Boheim, G. Irmscher und G. Jung (1978) Biochim. Biophys. Acta 507 485-506.

40) G. Jung, H. Brückner und B. Oertel (1978) Symp. Chem. of Peptides and Proteins, Grainau (Germany) 1978, Abstr. pp. 165-166.

41) B. Oertel (1978) Diplomarbeit, Universität Tübingen

42) H. Brückner, W.A. König, M. Greiner und G. Jung (1979) Angew. Chem. 91, 508-509; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 18, 476-477.

43) H. Brückner, G. Jung, W.A. König und E. Wachter (1979) in Peptides: Structure and Biological Function (E. Gross and J. Meienhofer,Editors), Pierce Chemical Comp., Rockford III., p. 723-726.

44) W.A. König, H. Krohn, M. Greiner, H. Brückner und G. Jung (1980) Adv. Mass Spec. 8, 1109-1115.

45) H. Brückner, W.A. König, E. Wachter und G. Jung (1979) Herbsttagung der Gesellschaft für Biologische Chemie, 26.-28. September 1979, Tübingen; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 360, 1135-1136.

46) K. Fuji, E. Fujita, Y. Takaishi, T. Fujita, J. Arita, M. Komatsu and N. Hiratsuka (1978) Experentia 34, 237.

47) T. Fujita, Y. Takaishi and T. Shiromoto (1979) J. C. S. Chem. Comm., 413.

48) P. Mueller and D.O. Rudin (1968) Nature 217, 713-719.

49) M. Pinkerton, L. Steinrauf und P. Dawkins (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 512.

50) D.W. Urry (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 672.

51) L.G.M. Gordon und D. A. Haydon (1972) Biochim. Biophys. Acta 255, 1014-1018.

52) G. Jung, H. Brückner, R. Oekonomopulos, G. Boheim, E. Breitmaier und W.A. König in Peptides: Structure and Biological Function (E. Gross and J. Meienhofer eds.) Pierce Chemical Comp., Rockford III., 1979 p. 647-654.

53) G. Jung, H. Schmitt and W. Winter in Peptides: Synthesis-Structure-Funktion (E. Gross and D.H. Richard, Editors), Pierce Chemical Comp., Rockford Ill., 1981, p. 311-314.

54) T. Butters, P. Hütter, G. Jung, P. Pauls, H. Schmitt G.M. Sheldrick and W. Winter, Angew. Chem. 93, (1981) 904-905.

55) H. Schmitt, W. Winter, R. Bosch and G. Jung Liebigs Ann. Chem. (1982) 1304-1321.

56) R.E. Yantorno, S. Takashima and P. Mueller Biophys. J. (1982) 38, 105-110.

57) G. Schwarz and P. Savko (1982) Biophys. J. 39, 211-219

58) G. Schwarz, P. Savko, and G. Jung (1983) Biochim. Biophys. Acta 728, 419-428.

59) G. Jung and R. Oekonomopulos (1979) Liebigs Ann. Chem. 1151-1172.

60) W. Hanke, C. Methfessel, H.-U. Wilmsen, E. Katz, G. Jung and G. Boheim (1983) Biochim. Biophys. Acta 727, 108-114.

61) G. Boheim, W. Hanke and G. Jung (1983) Biophys. Struct. Mech. 9, 181-192.

62) G. Jung, D. Leibfritz, M. Ottnad, N. Dubischar und H. Probst (1974) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 1213

63) C. Stumpf (1973) Diplomarbeit, Universität Tübingen

64) J.P. Famaey und M. W. Whitehouse (1975) Agents Actions 5, 133-136

65) B.C. Pressman (1968) Fed. Proc. 27, 1283-1288

66) F. Reusser (1967) J. Biol. Chem. 242, 243-247

67) H. Kleinkauf und H. Rindfleisch (1975) Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 22, 411-418

68) H. Rindfleisch und H. Kleinkauf (1976) FEBS Lett. 62, 276-280

69) H. Mohr (1977) Dissertation, Universität Berlin

70) H. Kleinkauf und H. Koischwitz (1978) Progr. Mol. Subcell. Biol. 6, 59-112

71) H. Mohr und H. Kleinkauf (1978) Biochem. Biophys. Acta 526, 375-386.

72) W. Mayr (1975), Diplomarbeit, Universität Tübingen

73) H. Fasold, Struktur der Proteine, Verlag Chemie (1972)

74) Sephadex-Gelfiltration in Theorie und Praxis Pharmacia Fine Chemicals AB/ S 75104 Uppsala 1 Sweden

75) Chromatographie Riedel; Riedel-de Haën AG D-3016 Seelze-1; Sorbenzien für die Säulen- und DC-Chromatographie

76) LOBAR^{R}-Fertigsäulen für die Flüssigkeitschromatographie Reagenzien Merck; E. Merck, Darmstadt

77) B.K. Filshie und G.E. Rogers (1962) J. cell. Biol. 13, 1

78) Pataki, G. (1966) Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie, De Gruyter & Co, Berlin

79) E. von Arx, M. Faupel und M. Brugger (1976) J. Chromatogr. 120, 224-228

80) J.A. Riddick und W.A. Burger (1970) Organic Solvents, Physical Properties and Methods of Purification, Wiley-Interscience, New York.

81) W. McFadden (1973) Techniques of Combined Gas Chromatography/Mass Spectrometry: Applications in Organic Analysis, Wiley, New York.

82) F. Weygand, A. Prox, H.H. Fessel und K. Kun Sun (1965) Z. Naturforsch. 206, 1169.

83) H.R. Schulten (1977) in Methods of Biochemical Analysis, Glick, D., Ed., Vol. 24, Wiley Interscience, New York.

84) F.M. Devienne and J.-C. Roustan (1982) Org. Mass Spectr. 17, 173-181.

85) D. Hazelby, S. Evans, D.R. Denne, C.C.E. Taylor (1982) Nachr. Chem. Tech. Lab. 30, 715-720.

86) M. Barber, R.S. Bordoli, G.J. Elliot, R.D. Sedgwick and A.N. Tyler (1982) Analytical Chemistry 54, 645A-657A.

87) G. Jung, M. Ottnad, W. Bohnenkamp, W. Bremser and U. Weser (1973) Biochim. Biophys. Acta 295, 77-86.

88) H. Brückner (1979) Dissertation, Universität Tübingen

89) E. Gil-Av, B. Feibush und R. Charles-Sigler (1967) in Gas Chromatography 1966, Littlewood, A.B., Ed., Institute of Petroleum, London, pp. 227-239.

90) H. Frank, G.J. Nicholson und E. Bayer (1977) J. Chrom. Sci. 15, 174-176.

91) H.Frank, G.J. Nicholson und E. Bayer (1978) J. Chromatogr. 146, 197-206.

92) H. Brückner,und G. Jung (1980) Chromatographia 13, 170-174.

93) H.Th. Bucherer und V.A. Lieb (1934) J. Prak. Chem. 141, 5-43.

94) S. Terashima, K. Achiwa und S. Yamada (1965) Chem. Pharm. Bull. 13, 1399-1407.

95) W.A. König, W. Rahn und J. Eyem (1977) J. Chrom. 133, 141-146.

96) E. Stahl (Ed.) (1967) Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl.

97) P. Edman und A. Henschen (1975) in Protein Sequence Determination, Needleman, S.B. (Ed.), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, pp. 232-279.

98) C.-I. Niu und H. Fraenkel-Conrat (1955) J. Amer. Chem. Soc. 77, 5882-5885.

99) B.S. Hartley und V. Massey (1956) Biochim. Biophys. Acta 21, 58-70.

100) F. Sanger und H. Truppy (1951) Biochem. J. 49, 463.

101) K. Randerath (1972) Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 2. Aufl.

102) H. Nau (1976) Angew. Chem. 88, 74-86.

103) H. Schmitt (1983) Dissertation, Universität Tübingen

104) J.A. Schellmann and P. Oriel (1962) J. Chem. Phys. 37, 2114.

105) N. Greenfield, B. Davidson und G.D. Fasman (1967) Biochemistry 6, 1630.

106) C. Djerassi (1960) Optical Rotatory Dispersion Applications to Organic Chemistry, McGraw-Hill Publ., New York, Toronto, London.

107) P. Crabbé (1965) Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry, Holden Day, San Francisco.

108) P. Crabbé (1972) ORD and CD in Chemistry and Biochemistry, Academic Press, New York.

109) B. Jirgensons (1973) Optical Activity of Proteins and other Macromolecules, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

110) G. Jung, N. Dubischar und D. Leibfritz (1975) Eur. J. Biochem. 54, 395-409.

111) A.I. McMullen, D.I. Marlborough und P.M. Bayley (1971) FEBS Lett. 16, 278.

112) N. Greenfield and G.D. Fasman (1969) Biochem. 8, 4108.

113) R. Oekonomopulos (1978) Dissertation, Universität Tübingen.

114) G.D. Smith, W.L. Duax, N.E. Kendrick, G.R. Marshall and F.S. Mathews (1977) in Peptides, M. Goodman and J. Meienhofer, Eds., Wiley, New York, p. 277-279.

115) N. Shamala, R. Nagaraj and P. Balaram (1978) J. C. S. Chem. Comm. 996-997.

116) N. Shamala, R. Nagaraj and P. Balaram (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 79, 292-298.

117) R. Nagaraj, N. Shamaly and P. Balaram (1979) J. Am. Chem. Soc. 101, 16-20.

118) Y.U. Venkatachalapathi und P. Balaram (1979) Nature 281, 83-84.

119) B.V. Venkataram Prasad, N. Shamala, R. Nagaraj, R. Chandrasekaran und P. Balaram (1979) Biopolymers 18, 1635-1646.

120) A.W. Burgess and S.J. Leach (1973) Biopolymers 12, 2599-2605.

121) B.R. Malcolm (1977) Biopolymers 16, 2591-2592.

122) R. Nagaraj and P. Balaram (1981) Biochemistry 20, 2828.

123) Ch.P. Rao, R. Nagaraj, C.N.R. Rao and P. Balaram (1980) Biochemistry 19, 425-431.

124) M. Iqbal and P. Balaram (1981) Biochemistry 20, 4866-4877.

125) M. Iqbal and P. Balaram (1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 5548-5552.

126) R. Bosch, W. Winter and G. Jung (1982) Liebigs Ann. Chem., 1322-1329.

127) G. Jung und H. Brückner (1979), Herbsttagung der Gesellschaft für Biologische Chemie, 26.-28. September 1979, Tübingen; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1159-1160.

128) W. Mayr, H. Brückner, R. Oekonomopulos und G. Jung (1979), Herbsttagung der Gesellschaft für Biologische Chemie,26.-28. September 1979, Tübingen; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1176-1177.

129) Venkatachalam, C.M. (1968) Biopolymers 6, 1425-1436.

130) G. Jung, H. Brückner, R. Oekonomopulos, G. Boheim, E. Breitmaier und W.A. König (1979) in Peptides: Structure and Biological Funktion (E. Gross, J. Meienhofer,Eds) Pierce Chem. Comp., Rockford Ill., 1979, p. 723-726.

131) G. Jung, R. Bosch, E. Katz, H. Schmitt, K.P. Voges and W. Winter (1983) Biopolymers 22, 241-246.

132) D.A. Bullough, C.G. Jackson, P.F.J. Henderson, F.H. Gottee, R.B. Beechey and P.E. Linnett (1982) Biochem. Internat. 4, 543-549.

133) H. Brückner und H. Graf (1983) Experientia 39, 528-530.

134) J.C. Williams and R.M. Bell (1972) Biochim. Biophys. Acta 288, 255-262.

135) J. Jentsch, Liebigs Ann. Chem. (1972) 757, 193-195.

136) R. Oekonomopulos und G. Jung (1979) Liebigs Ann. Chem. 1151-1172.

137) L.G.M. Gordon und D.A. Haydon (1975) Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 270, 433-447.

138) G. Boheim und J.E. Hall (1975) Biochim. Biophys. Acta 389, 436-443.

139) P. Mueller (1975) Ann. New York Acad. Sci. 264, 247-264.

140) L.G.M. Gordon und D.A. Haydon (1976) Biochim. Biophys. Acta 436, 541-556.

141) G. Boheim und H.A. Kolb (1978) J. Membrane Biol. 38, 99-150.

142) R.O. Fox and F.M. Richards (1982) Nature 300, 325-330.

143) P. Harter und U. Weber (1975) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 693-699.

144) K.P. Voges (1983) Dissertation, Universität Tübingen

145) J. Schultz, S. Klumpp und G. Jung (1983) Manuskript eingereicht.

146) E. Habermann und H. Kowallek (1970) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 884-890.

147) R.E. Dickerson und I. Geis (1971) Struktur und Funktion der Proteine, Verlag Chemie,Weinheim.

148) W.F. De Grado, G.F. Musso, M. Lieber, E.T. Kaiser und F.J. Kezdy (1982) Biophys. J. 37, 329-338.

149) G. Irmscher, G. Bovermann, G. Boheim und G. Jung (1978) Biochim. Biophys. Acta 507, 470-484.

150) D. Leibfritz, E. Haupt, N. Dubischar, H. Lachmann, R. Oekonomopulos und G. Jung (1982) Tetrahedron 38, 2165-2181.

151) R. Oekonomopulos, G. Jung und D. Leibfritz (1982) Tetrahedron 38,2157-2164.

152) G. Jung, H. Brückner, R. Bosch, W. Winter, H. Schaal und J. Strähle (1983) Liebigs Ann. Chem. in print

153) R. Bosch, H. Brückner, G. Jung und W. Winter Tetrahedron 38, (1982) 3579-3583.

154) H. Brückner, G.J. Nicholson, G. Jung, K. Kruse und W.A. König (1980) Chromatographia 13, 715-724.

155) M. Branik und H. Kessler (1975) Chem. Ber. 108, 2176-2188.

156) S.L. Patt und J.N. Shoolery (1982) J. of Magn. Res. 46, 535-539.

157) D.J. Cookson und B.E. Smith (1981) Org. Magn. Res. 16, 111-116.

158) C. Le Coco und J.Y. Lallemand (1981) J.C.S. Chem. Comm. (1981) 151-153.

Außer den im Text bereits erwähnten Personen möchte ich mich bei folgenden Mitarbeitern und Kollegen des Chemischen Institutes für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung ganz besonders bedanken: Fr. Maria Munari (Aminosäureanalyse), Fr. Ursula Becker (techn. Assistenz), Fr. Stegmann (Fotoarbeiten), Herrn G. J. Nicholson (GC, GC-MS), Herrn H. Bartholomä und Herrn Dr. R. Müller (FDMS) sowie Herrn R. Betthauer und Herrn Dipl. Chem. H. Kolshorn (NMR-Spektroskopie).

Besonderer Dank gebührt den Mitgliedern des Arbeitskreises Jung für das ausgezeichnete Arbeitsklima.

Lebenslauf

Am 18. Oktober 1954 wurde ich als Tochter von Otto Katz und Hilde Katz, geb. Kneissler, in Altensteig (Baden-Württemberg, Kreis Calw) geboren.

1961-1965	Grundschule Altensteig
1965-1973	Jugenddorf-Christophorus-Schule Altensteig, neusprachl. Gymnasium
1973	Abitur
1974	Immatrikulation an der Eberhard - Karls-Universität Tübingen in den Fächern Chemie/Biologie, Staatsexamen
26.4.1979	Staatsexamen Chemie
1979	Staatsexamen-Zulassungsarbeit in Org. Chemie
April 1980	Staatsexamen Biologie
November 1980	Beginn der vorliegenden Dissertation unter Betreuung von Prof. Dr. G. Jung Abschluß des experimentellen Teils im Januar 1983

Meine akademische Ausbildung verdanke ich:
D. Ammermann, E. Bayer, W. Braun, K. Drumm, W. Engels, K. Grell, M. Hanack, G. Jung, S. Kemmler-Sack, D. Krug, E. Kulzer, E. Lindner, I.P. Lorenz, H. Mauser, H. Meier, H. Metzner, F.P.Möhres, H. Oberhammer, D. Oelkrug, F. Oberwinkler, G. Pausewang, W. Rüdorff, F.F.Seelig, B. Schwemmle, J. Strähle, H. Stegmann, H. Suhr, H. Zähner, W. Zeil, K.-P. Zeller

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45